

LARISSA KOCHENBORGER

**PAPEL DA ATIVAÇÃO DOS RECEPTORES CB1 NA
CONCHA DO NÚCLEO ACCUMBENS SOBRE A ANSIEDADE
E INGESTÃO ALIMENTAR EM RATOS.**

Tese de Doutorado
apresentada ao curso de Pós-
Graduação em Neurociências
da Universidade Federal de
Santa Catarina.

**Orientador: Prof. Dr.
Moacir Serralvo Faria.**

Florianópolis, SC

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Kochenborger, Larissa
PAPEL DA ATIVAÇÃO DOS RECEPTORES CB1 NA CONCHA DO NÚCLEO
ACCUMBENS SOBRE A ANSIEDADE E INGESTÃO ALIMENTAR EM RATOS.
/ Larissa Kochenborger ; orientador, Moacir Serralvo Faria
- Florianópolis, SC, 2016.
101 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós
Graduação em Neurociências.

Inclui referências

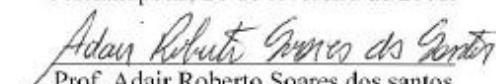
1. Neurociências. 2. Núcleo Accumbens. 3. Ansiedade. 4.
Ingestão alimentar. 5. Receptores CB1. I. Faria, Moacir
Serralvo. II. Universidade Federal de Santa Catarina.
Programa de Pós-Graduação em Neurociências. III. Título.

LARISSA KOCHENBORGER

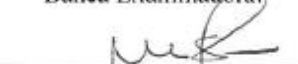
**“PAPEL DA ATIVAÇÃO DOS RECEPTORES CBI NA
CONCHA DO NÚCLEO ACCUMBENS SOBRE A
ANSIEDADE E INGESTÃO ALIMENTAR EM RATOS”.**

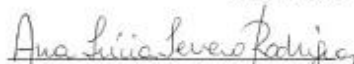
Esta tese foi julgada e aprovada para a obtenção do Grau de
Doutor em Neurociências na área de Neuropsicobiologia no
Programa de Pós-Graduação em Neurociências da Universidade
Federal de Santa Catarina


Florianópolis, 26 de fevereiro de 2016.


Prof. Adair Roberto Soares dos Santos
Coordenador do Curso

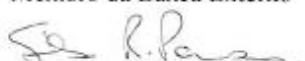
Banca Examinadora:


Prof. Moacir Serravallo Faria
Orientador – UFSC


Prof. Ana Lúcia S. Rodrigues
Membro - UFSC


Prof. Ana Paula F. Lopes
Membro da Banca Externo


Prof. Fernanda B.-L. Christian
Membro - UFSC


Prof. Silvia Rosane Parcias
Membro da Banca Externo


Prof. Vander Baptista
Membro – UFSC

Velho Tema

*Só a leve esperança, em toda a vida,
Disfarça a pena de viver, mais nada;
Nem é mais a existência, resumida,
Que uma grande esperança malograda.*

*O eterno sonho da alma desterrada
Sonho que a traz ansiosa e embevecida,
É uma hora feliz, sempre adiada
E que não chega nunca em toda a vida.*

*Essa felicidade que supomos,
Árvore milagrosa que sonhamos
Toda arreada de dourados pomos,*

*Existe, sim: mas nós não a alcançamos
Porque está sempre apenas onde a pomos
E nunca a pomos onde nós estamos.*

(Vicente de Carvalho)

Dedico essa Tese à minha avó Livina dos Santos Feistauer (*in memorian*), que até os últimos momentos de sua caminhada terrena dizia que seu maior orgulho era ter sua única neta Doutora.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por tudo que me permitiu alcançar na trajetória acadêmica, por tudo e todos que colocou no meu caminho, pelas dificuldades que me ensinaram e pelos maravilhosos momentos vividos até então.

Aos meus pais Walter e Salete, por ser a base na minha caminhada! Obrigada por existirem e pelo imenso amor e ensinamentos, amo vocês!

Aos meus padrinhos amados, Maria Ana e João Germano e meus primos Matheus Gustavo e Thomás Guilherme (*in memoriam*) pelo carinho e amor incondicionais! Obrigada por caminharem comigo por todos esses anos, mesmo que apenas em pensamento, muitas das vezes...

Ao meu orientador, professor Dr. Moacir Serralvo Faria, com quem compartilhei mais de seis anos de caminhada em seu laboratório contando com seu profissionalismo e parceria sempre! Agradeço pelo exemplo de professor e pesquisador, por sua ética e sua dedicação. Muito obrigada pelas conversas, pelos momentos de ensinamento e pelo grande apoio em todos os momentos.

Agradeço aos meus queridos amigos da pós-graduação e do departamento: Thaís, Thayzinha, Amanda, Júlia, Flaviano, Paola, Fernanda, Fernando, Aledson, Ana Cláudia, Fernandinho, Karol e a todos que tenha esquecido aqui de agradecer, meu muito obrigado pelos momentos especiais que passamos juntos, pelo café na cozinha, pelas risadas, conversas, pelos momentos em construção e descontração, pelas trocas de idéias, pela amizade e auxílio em muitos momentos!

Aos meus queridos colegas do laboratório: Rafa, Anderson, Dayanne e Anthony, meus sinceros agradecimentos por tudo, pelos bons momentos compartilhados com vocês.

Aos meus grandes amigos do coração: Brunno, Marieli, Lucas, Ana Taschetto, Daniel, Elisa e Cristiane Lavado. Agradeço por tudo! Vocês foram e sempre serão aqueles que guardarei no coração onde quer que eu vá. Muitos já estão fisicamente longe nesse momento, mas nunca longe dos meus pensamentos! Cada um significa muito pra mim! Foram meu porto seguro em muitos momentos! Amo vocês de coração!

Aos meus queridos amigos que a pós-graduação me trouxe: Wellington, Carol e Leo. Obrigada por cada momento especial compartilhado e por vocês serem essas pessoas fantásticas que apareceram na minha caminhada! Sempre foi animador estar na companhia de vocês! Tenho um carinho imenso por cada um em especial! Obrigada por vocês existirem!

Aos professores que sempre cederam gentilmente seus laboratórios para a realização desse trabalho e que de alguma forma contribuíram para a execução do mesmo: professoras, Marta Aparecida Paschoalini e Mariana Graciela Terenzi. Agradeço também a todos os professores que me deram aula na pós-graduação contribuindo para minha formação!

Aos professores membros da banca: Vander Baptista, Fernanda Barbosa Lima Christian, Ana Lúcia Severo Rodrigues, Ana Paula Fraga Lopes e Silvia Rosane Parcias por terem aceitado o convite e pelas contribuições ao trabalho realizado.

Aos queridos e sempre amigos do departamento e da pós, Seu Carlos, Dona Vilma e Nivaldo por tudo, todos os momentos de auxílio e amizade nesse período. Muito obrigada!

Aos técnicos do LAMEB (Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia), pelo enorme auxílio na realização deste trabalho.

Aos demais amigos não citados, de Florianópolis, Curitiba-PR e Carazinho-RS pelo carinho e apoio.

A CAPES pelo apoio financeiro.

Aos animais que tornaram possível a realização desse trabalho.

RESUMO

Esse estudo investigou o efeito de um agonista e antagonista canabinóides injetados na região rostral da concha do Núcleo Accumbens (cnAcb) sobre comportamentos relacionados à ansiedade e ingestão alimentar. Ratos Wistar machos de aproximadamente dois meses (270g-290g) foram unilateralmente injetados com ACEA (Araquidonoil-2-Cloroetilamida, um agonista de receptores canabinóides tipo 1) nas doses de 0,005, 0,05 ou 0,5 pmol, ou veículo (VEH, etanol 0,04% em salina 0,9%) na região da cnAcb e posteriormente submetidos ao Labirinto em Cruz Elevado (LCE), um teste pré-clínico de ansiedade. Outro grupo de animais foi submetido à caixa de ingestão, onde foram ambientados dois dias antes do experimento, foram privados de alimento 24 horas antes do teste e no dia do teste receberam as microinjeções unilaterais ACEA ou AM251 ((N-(Piperidina - 1 - yl) - 5 - (4 - iodofenil) - 1 - (2 , 4 - diclorofenil) - 4 - metil - 1 H - pirazol - 3 - carboxamida, um antagonista de receptores canabinóides tipo 1, CB1), posteriormente submetidos à caixa de ingestão para avaliação de comportamentos ingestivos e não ingestivos. Com relação ao LCE, os dados mostraram que os ratos injetados com ACEA (0,05 pmol/0,2µl) na cnAcb, exibiram uma diminuição do número de entradas nos braços abertos do LCE e da % de tempo de permanência nos braços abertos em comparação aos animais do grupo controle tratados com veículo, o que demonstra efeito ansiogênico. As demais doses de 0,005 ou 0,5 pmol não alteraram o comportamento dos animais no LCE. Para descartar a hipótese de dispersão da droga para o ventrículo lateral devido à proximidade anatômica com o nAcb, a dose que promoveu efeito ansiogênico, ACEA 0,05pmol, foi injetada no ventrículo lateral e não alterou as respostas representativas de medo/ansiedade nem atividade locomotora no LCE, demonstrando assim que o efeito que observamos foi devido a ação na cnAcb. Com relação a ingestão alimentar, ACEA não alterou a quantidade de alimento ingerido, nem a frequência, duração e latência da ingestão alimentar, nem os comportamentos não ingestivos. AM251 também não alterou os comportamentos ingestivos e não ingestivos. Esses dados sugerem que a ativação dos receptores canabinóides na cnAcb rostral, pode modular os comportamentos de medo/ansiedade no LCE, mas não modula comportamentos ingestivos em ratos privados de alimento.

Palavras Chave: Núcleo Accumbens, Ansiedade, Ingestão Alimentar, CB1, ACEA, AM251.

ABSTRACT

This study investigated the effect of a cannabinoid agonist and antagonist injected into the rostral region of the nucleus Accumbens shell (AcbSh) on anxiety related behaviors and food intake. Male Wistar rats of approximately two months (270g-290g) were unilaterally injected with ACEA (Arachidonyl-2'-chloroethylamide, a CB1 receptor agonist) at doses of 0.005, 0.05 or 0.5 pmol, or vehicle (VEH, 0.04% ethanol in saline 0.9%) in the region shell of nAcb and submitted to the Elevated Plus Maze (EPM), a preclinical test of anxiety. Other animal group was submitted to feeding box test, which were acclimated two days before the experiment, were deprived of food 24 hours before the test, and on the day of the test received unilateral microinjections of ACEA or AM251 (*N*-(Piperidin-1-yl)-5-(4-iodophenyl)-1-(2,4-dichlorophenyl)-4-methyl-1*H*-pyrazole-3-carboxamide, a CB1 receptor antagonist), subsequently submitted to the feeding box to the ingestive and non ingestive behaviors evaluation. In relation to EPM, the data showed that rats injected with ACEA (0.05 pmol / 0.2µl) in the AcbSh, exhibited a decrease in number of entries and % of time into the open arms of the maze (EPM) compared to control group treated with vehicle, indicating an anxiogenic effect. Other treatments of 0.005 or 0.5 pmol did not change the behavior of animals in the EPM. To discard the possibility of drug dispersion into the lateral ventricle due to anatomical proximity to the AcbSh, the dose that promoted anxiogenic effect, ACEA 0.05pmol, was injected into the lateral ventricle and did not alter the representative responses of fear / anxiety or locomotor activity in EPM, thus demonstrating the regional characteristics of the drug effect only in the nAcb shell. Regarding the food intake, ACEA did not alter the amount of food intake or the frequency, duration and latency of food intake, or non ingestive behaviors. AM251 also did not alter the ingestive or non ingestive behaviors. These data suggest that activation of cannabinoid receptors in the AcbSh may modulate the behaviors of fear/anxiety in EPM, but do not modulate ingestive behaviors in rats deprived of food.

Keywords: Nucleus Accumbens, Anxiety, Food intake, CB1, ACEA, AM251.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Resultados da ANOVA de uma via mostrando os comportamentos dos ratos testados no Labirinto em Cruz Elevado após a microinjeção com veículo ou as doses de ACEA na região da concha do núcleo Accumbens.....58

Tabela 2. Resultados da ANOVA de uma via mostrando os comportamentos dos ratos testados no Labirinto em Cruz Elevado após a microinjeção com veículo ou ACEA (0,05 pmol) no Ventrículo Lateral.....59

Tabela 3. Resultados da ANOVA de uma via mostrando os comportamentos dos ratos testados na caixa de registro comportamental após a microinjeção com veículo ou as doses de ACEA na região da concha do Núcleo Accumbens.....66

Tabela 4. Resultados da ANOVA de uma via mostrando os comportamentos dos ratos testados na caixa de registro comportamental após a microinjeção com veículo ou as doses de AM251 na região da concha do Núcleo Accumbens.....67

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. A. Representação esquemática e tridimensional do posicionamento do Acb no encéfalo do rato e suas regiões, extraído e adaptado de BASAR *et al.*, 2010. B, Corte histológico no plano coronal do encéfalo do rato, extraído e adaptado do Atlas PAXINOS e WATSON, 2007, demonstrando as mesmas estruturas de A.....27

FIGURA 2. Fotografia do Labirinto em Cruz Elevado, usado nos experimentos.....29

FIGURA 3. Fotografia da Caixa de registro dos comportamentos ingestivos e não ingestivos usada nos experimentos.....31

FIGURA 4. Representação esquemática do sistema canabinóide e sua sinalização retrógrada.....33

FIGURA 5. Fotografia do aparelho estereotáxico utilizado nos procedimentos cirúrgicos.....42

FIGURA 6. Desenho experimental.....48

FIGURA 7. Distribuição das microinjeções de ACEA na região rostral da concha do Núcleo Accumbens de ratos submetidos ao teste do Labirinto em Cruz Elevado.....51

FIGURA 8. Distribuição das microinjeções de ACEA na região rostral da concha do Núcleo Accumbens de ratos submetidos ao teste de ingestão alimentar e fotomicrografia mostrando o local de uma microinjeção.....52

FIGURA 9. Posicionamento das microinjeções de AM251 na região rostral da concha do Núcleo Accumbens de ratos submetidos ao teste de ingestão alimentar.....53

FIGURA 10. Fotomicrografia mostrando o local de uma microinjeção.....55

FIGURA 11. Representação do efeito ansiogênico induzido pela microinjeção de ACEA na concha do Núcleo Accumbens.....56

FIGURA 12. Número de entradas nos braços abertos e fechados do Labirinto em Cruz Elevado após a microinjeção de ACEA na concha do Núcleo Accumbens.....57

FIGURA 13. Representação dos comportamentos ingestivos na caixa de registro comportamental após a microinjeção de ACEA na concha do Núcleo Accumbens.....62

FIGURA 14. Representação do aumento da ingestão alimentar causado pela privação alimentar, no dia 3 (dia do experimento após 24h de privação alimentar) de ratos submetidos à microinjeção de ACEA.....63

FIGURA 15. Representação dos comportamentos ingestivos na caixa de registro comportamental após a microinjeção de AM251 na concha do Núcleo Accumbens.....64

FIGURA 16. Aumento da ingestão alimentar causado pela restrição alimentar, no dia 3 (dia do experimento após 24h de privação alimentar) de ratos submetidos à microinjeção de AM251.....65

LISTA DE ABREVIÇÕES

2-AG: 2-araquidonilglicerol

%EA: Porcentagem de entrada nos braços abertos do Labirinto em Cruz Elevado

%TA: Porcentagem de tempo de permanência nos braços abertos

Δ^9 -THC: Delta-9-tetra-hidrocanabinol

μ l: Microlitros

μ m: Micrômetros

AA5HT: *N*-araquidonoil-serotonina

aca: comissura anterior

AcbC: centro do núcleo accumbens

AcbSh: Do inglês, Nucleus Accumbens Shell

ACEA: Araquidonoil-2-Cloroetilamida

ACPA: (*N*-(Ciclopropil)-5*Z*,8*Z*,11*Z*,14*Z*-eicosatetraenamida

AEA: *N*-araquidoniletanolamina

AL: Auto-limpeza

AM251: (*N*-(Piperidina-1-yl)-5-(4-iodofenil)-1-(2,4-diclorofenil)-4-metil-1*H*-pirazol-3-carboxamida

AM404: (*N*-(4-Hidroxifenil)-5*Z*,8*Z*,11*Z*,14*Z*-eicosatetraenamida

AMPA: Ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol Propiônico

ANOVA: Análise de Variância

beta-CCE: Etil-Beta-Carbolina-3-Carboxilato

CB1: Receptor canabinóide do tipo 1

CB2: Receptor canabinóide do tipo 2

CEUA: Comitê de Ética ao Uso de Animais

cnAcb: Região da Concha do Núcleo Accumbens

cm: Centímetros

CP 55,940: (-)-cis-3-[2-Hidroxi-4-(1,1-dimetil heptil)phenyl]-trans-4-(3 hidroxipropil)ciclohexano.

CPu: caudado putamen (estriado)

DAG: 1,2-diacilglicerol

DGL: Diacilglicerol lipase

dIPAG: Substância cinzenta periaquedutal dorsolateral

EA: Número de entradas nos braços abertos

eCBs: Endocanabinóides

EF: Número de Entrada nos Braços Fechados

ENL: Exploração não locomotora

EPM: Do inglês, Elevated Plus Maze

ET: Total de entradas

EV: Exploração Vertical

FAAH: Enzima Amido Hidrolase de Ácidos graxos

FG 7142: N-Metil-Beta-Carbolina-3-Carboxamida

GABA: Ácido gama-aminobutírico

h: Horas

IAL: Ingestão alimentar

i.p.: Intraperitoneal

IC: Imersão de Cabeça

ICj: ilhas de Calleja

ICjM: ilhas de Calleja, grande ilha

LAcbSh: concha lateral do Accumbens

LCE: Labirinto em Cruz Elevado

LV: Do Inglês, Lateral Ventricle

MGL: Monoacilglicerol Lipase

mm: Milímetros

nAcb: Núcleo Accumbens

NAPE: N-arachidonoilfosfatidiletanolamina

nl: Nanolitros

NS: Não significativa

NTS: Núcleo do Trato Solitário

OMDM-1: (R)-N-oleoil-(10-hidroxibenzil)-20-etanol amina

PI: Fosfatidilinositol (PI)

PLC: Fosfolipase C

SAP: Do inglês, “Stretched-Attend Postures”

TRPV1: Receptor de Potencial Transiente Vanilóide 1

URB597: Ácido Ciclohexil Carbônico 3'-(Amino Carbonil)-[1,1'-bifenil]-3-yl ester

VEH: Veículo/Vehicle

VL: Ventrículo Lateral

W: Watts

WIN 55,212-2: (R)-[2,3-Diidro-5-metil-3-(4-morfolinilmetil)pirrolo[1,2,3-de]-1,4-benzoxazina-6-il]-1-naftalenilmetanona.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	7
RESUMO.....	10
ABSTRACT.....	11
LISTA DE TABELAS.....	12
LISTA DE FIGURAS.....	13
LISTA DE ABREVIACÕES.....	16
1. INTRODUÇÃO	23
<i>1.1. Núcleo Accumbens.....</i>	<i>24</i>
<i>1.2. Labirinto em Cruz Elevado.....</i>	<i>27</i>
<i>1.3. Caixa de Ingestão</i>	<i>30</i>
<i>1.4. Sistema Canabinóide</i>	<i>31</i>
1.4.1 Endocanabinóides.....	31
1.4.2 Canabinóides e Ansiedade	34
1.4.3 Canabinóides e Ingestão alimentar	36
2. OBJETIVOS	39
<i>2.1. Objetivo Geral.....</i>	<i>39</i>
<i>2.2. Objetivos Específicos</i>	<i>39</i>

3. MATERIAL E MÉTODOS	40
3.1. Animais.....	40
3.2. Drogas.....	40
3.3. Implantação unilateral de cânulas-guia no Accumbens ..	41
3.4. Implantação de cânulas-guia no Ventrículo Lateral.....	42
3.5. Testes.....	43
3.5.1 Teste do Labirinto em Cruz Elevado (LCE)	43
3.5.2 Teste de Ingestão alimentar	44
3.6. Procedimentos Experimentais.....	45
3.6.1 Experimento 1.	45
3.6.2 Experimento 2.	45
3.6.3 Experimento 3.	46
3.7. Histologia.....	46
3.8. Análise Estatística	47
3.9. Desenho Experimental	48
4. RESULTADOS	49
4.1. Microinjeções.....	49
4.2. Experimento 1 e 2: Teste do Labirinto em Cruz Elevado.	54
4.3. Experimento 3: Teste de Ingestão alimentar.....	60
5. DISCUSSÃO	68
5.1 Ansiedade.....	68

5.2 <i>Ingestão Alimentar</i>	72
6. CONCLUSÕES	76
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77
8. ANEXOS	98

1. INTRODUÇÃO

Nosso laboratório vem trabalhando ao longo dos últimos 10 anos em pesquisas que busquem desvendar o papel do Núcleo Accumbens (nAcb) sobre comportamentos de ansiedade e ingestão alimentar em ratos. Muito já foi estudado e descoberto sobre a influência dos múltiplos sistemas de neurotransmissão desse núcleo, que é amplamente influenciado por diversos neurotransmissores e complexamente interligado com inúmeras regiões encefálicas (para revisão ver BASAR *et al.*, 2010). LOPES *et al.* em 2007 mostraram que os agonistas dos receptores GABA (Ácido gama-aminobutírico), quando injetados na região da concha do Núcleo Accumbens (cnAcb), induziram efeitos ansiolíticos em ratos testados no LCE. DA CUNHA *et al.*, 2008a, 2008b mostraram um efeito ansiolítico após a administração de antagonistas de receptores AMPA (Ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol Propiônico) na cnAcb rostral em ratos testados no Labirinto em Cruz Elevado (LCE). KOCHENBORGER *et al.*, 2012, mostraram um efeito ansiolítico do agonista adrenérgico $\alpha 2$ injetado na cnAcb rostral em ratos submetidos ao LCE. Percebe-se que a cnAcb exibe uma importante influência nos estados emocionais e demonstramos que esta é modulada por pelo menos três sistemas de neurotransmissão diferentes de acordo com nossas pesquisas anteriores.

Sabe-se também que a cnAcb modula comportamentos ingestivos através de muitos sistemas neuroquímicos como demonstrado por nosso grupo. LOPES *et al.*, 2007 e 2012, demonstraram a modulação da ingestão de alimentos em ratos saciados e privados de alimento através do sistema GABAérgico. Estudos nos quais obtivemos respostas relacionadas à ansiedade (DA CUNHA *et al.*, 2008a; KOCHENBORGER *et al.*, 2012) não demonstraram efeitos da neurotransmissão glutamatérgica e noradrenérgica sobre a ingestão alimentar, e a manipulação farmacológica desses receptores localizados rostralmente na cnAcb não foi capaz de alterar a ingestão em ratos saciados, embora a literatura disponha de trabalhos demonstrando essa relação (KELLEY e SWANSON, 1997; STRATFORD *et al.*, 1998).

Tendo esses trabalhos anteriores do nosso grupo como base de dados a respeito do nAcb, objetivamos neste presente estudo avaliar a influência dos receptores canabinóides do tipo 1 (CB1) sobre os comportamentos defensivos e ingestivos, tendo em vista a ampla importância dos canabinóides na modulação da ansiedade e ingestão, e o fato de não haver estudos demonstrando sua participação na cnAcb sobre comportamentos de ansiedade e ingestão de alimento em animais privados de alimento por 24 horas. Dessa forma, esperamos contribuir para a compreensão de mais um sistema de neurotransmissão desse núcleo que é nosso objetivo de estudos há muito tempo.

1.1 Núcleo Accumbens

O nAcb é uma área encefálica dividida em duas regiões distintas, região do centro (que regula preferencialmente funções motoras) e região da concha (relacionada a funções límbicas). Este núcleo forma uma ampla parte do estriado ventral (Figura 1), estando localizado medialmente à cabeça do caudado no prosencéfalo basal (BASAR *et al.*, 2010); em humanos sua posição é dorsalmente ao giro caudal do córtex órbito-frontal e em ratos está posicionado dorsalmente ao tubérculo olfatório.

O Accumbens é um núcleo que possui aferências e eferências para muitos outros núcleos e participa da modulação de diversos comportamentos como comportamento sexual, comportamentos ingestivos e defensivos, motivação, reforço e também influencia a modulação da neurotransmissão em diversas outras estruturas encefálicas (BASAR *et al.*, 2010).

A cnAcb se comunica vastamente com regiões como tálamo, hipotálamo, hipocampo, amígdala, córtex pré-frontal medial, pálido ventral, núcleo do trato solitário, substância negra e área tegmental ventral, estando portanto amplamente envolvida com funções límbicas e constantemente sob influência de múltiplos sistemas de

neurotransmissão, tais como glutamato, GABA, peptídeos opióides, dopamina e noradrenalina (BASAR *et al.*, 2010; HEIMER *et al.*, 1991; ZAHM e BROG, 1992; BAGOT *et al.*, 2015).

A *cnAcb* recebe projeções dopaminérgicas da área tegmental ventral relacionadas ao condicionamento pelo medo e reforço (PEZZE e FELDON, 2004; NAUTA *et al.*, 1978), também recebe projeções noradrenérgicas do núcleo do trato solitário (NTS; DELFS *et al.*, 1998) e projeções glutamatérgicas que provém do córtex pré-frontal medial, amígdala basolateral e formação hipocampal (MORGANE *et al.*, 2005; BAGOT *et al.*, 2015), cujas quais regiões estão amplamente envolvidas no processamento de estímulos emocionais, convergem sobre os neurônios GABAérgicos da *cnAcb* (HEIDBREDE e GROENEWEGEN, 2003), indicando que a *cnAcb* integra estes estímulos emocionais inicialmente processados por tais regiões (REYNOLDS e BERRIDGE, 2002; SEAMANS e PHILLIPS, 1994; SETLOW *et al.*, 2000; BAGOT *et al.*, 2015).

A modulação de comportamentos defensivos pelo *nAcb* é bem conhecida, em que a manipulação farmacológica de sistemas neurotransmissores como o GABAérgico, glutamatérgico e noradrenérgico promove diferentes efeitos em ratos testados no LCE. Agonistas GABAérgicos na *cnAcb* rostral demonstraram um efeito ansiolítico em ratos testados no LCE (LOPES *et al.*, 2007 e 2012). Um agonista adrenérgico α_2 , a clonidina, injetado na *cnAcb* rostral também promoveu uma resposta de ansiólise em ratos submetidos ao LCE (KOCHENBORGER *et al.*, 2012).

O papel do glutamato na região da *cnAcb* na modulação da ansiedade é também bem estabelecido. Alguns estudos demonstram que a microinjeção de antagonistas dos receptores AMPA na *cnAcb* evoca comportamentos defensivos em ratos (fugas, mordidas defensivas e vocalizações; REYNOLDS e BERRIDGE, 2003). Estudos do nosso grupo demonstram respostas contrárias a esse achado, uma vez que o bloqueio dos receptores AMPA na *cnAcb* induz efeito do tipo ansiolítico em ratos testados no LCE, (DA CUNHA *et al.*, 2008a, 2008b).

REYNOLDS e BERRIDGE, 2001 e 2002 também demonstram o papel do *nAcb* sobre comportamentos defensivos, manipulando farmacologicamente os sistemas glutamatérgico e GABAérgico e inclusive demonstraram que há uma diferença no gradiente

rostrocaudal de ativação dos receptores no Acb, onde regiões rostrais e caudais modulam diferentemente ansiedade e ingestão alimentar.

A respeito da relação entre o sistema canabinóide e os comportamentos defensivos, não há trabalhos na literatura que demonstrem os efeitos da manipulação farmacológica de receptores CB₁ na concha do accumbens sobre comportamentos de ansiedade no LCE, por este motivo é que nosso trabalho é de fundamental relevância nesse campo de estudo.

A modulação da ingestão de alimentos pelo nAcb também é bem descrita pela literatura. Com relação à neurotransmissão GABAérgica, tem sido demonstrado que a microinjeção de agonistas dos receptores GABA_A e GABA_B na cnAcb aumenta a ingestão de alimentos em ratos saciados (LOPES *et al.*, 2007, REYNOLDS e BERRIDGE, 2001; BASSO e KELLEY, 1999; STRATFORD e KELLEY, 1999; STRATFORD e KELLEY, 1997), enquanto a microinjeção de antagonistas GABA na cnAcb diminui a ingestão de alimento induzida por agonistas GABAérgicos (STRATFORD e KELLEY, 1997; ZNAMENSKY *et al.*, 2001).

Elevados níveis de ingestão de alimento (efeito hiperfágico) também têm sido obtidos pela microinjeção de antagonistas dos receptores glutamatérgicos do tipo AMPA na cnAcb (KELLEY e SWANSON, 1997; STRATFORD *et al.*, 1998). Sabe-se também que a modulação da ingestão de alimentos por opioides no nAcb é bem estabelecida (KELLEY *et al.*, 2005) e a microinjeção de agonistas dos receptores opióides do tipo μ na região da cnAcb induz aumento da ingestão de alimentos em ratos (MACDONALD *et al.*, 2004).

Com relação aos endocanabinóides, agonistas canabinóides na cnAcb demonstram uma resposta de hiperfagia (CORTÉS-SALAZAR *et al.*, 2012 e 2014) e esse efeito é geralmente bloqueado com a ação de antagonistas (SORIA-GÓMEZ *et al.*, 2007 e 2010). A microinjeção de anandamida na cnAcb também induziu hiperfagia (KIRKHAM *et al.*, 2002; MAHLER *et al.*, 2007). Além disso, a ativação dos receptores CB₁ na cnAcb aumenta o consumo de alimento favorecendo o consumo de componentes nutricionais de elevado valor hedônico (MAHLER *et al.*, 2007; ESCARTÍN-PÉREZ *et al.*, 2009).

Dessa forma observa-se que o nAcb é um importante modulador de sistemas que estão diretamente envolvidos nos comportamentos defensivos e ingestão alimentar e a ativação ou

bloqueio de sua neurotransmissão local pode evidenciar efeitos diversos sobre esses comportamentos.

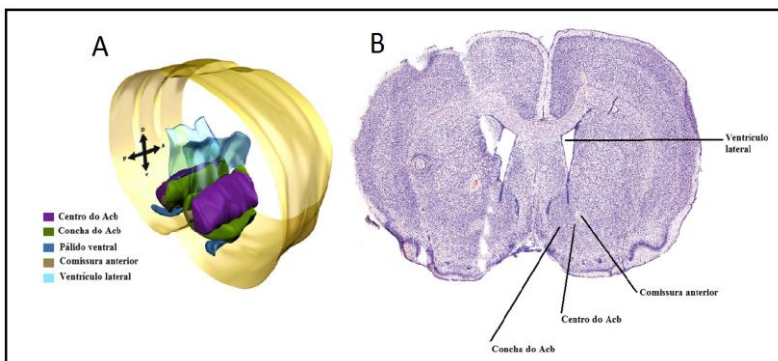


Figura 1. A. Representação esquemática e tridimensional do posicionamento do Acb no encéfalo do rato e suas regiões, (extraído e adaptado de BASAR *et al.*, 2010). B, Corte histológico no plano coronal do encéfalo do rato, (extraído e adaptado do Atlas PAXINOS e WATSON, 2007), demonstrando as mesmas estruturas de A.

1.2 Labirinto em Cruz Elevado

O Labirinto em Cruz Elevado (LCE) é um modelo bastante utilizando pelo nosso grupo de pesquisa e bem estabelecido pela literatura, como um modelo de ansiedade baseado no estudo do comportamento espontâneo e incondicionado (RODGERS e DALVI,

1997) no qual a exposição de roedores ao mesmo produz efeitos fisiológicos e comportamentais que consistem em medo/ansiedade. O ambiente do LCE é onde o animal evoca ao mesmo tempo medo e curiosidade, promovendo um conflito para a exploração do mesmo (RODGERS *et al.*, 1999). Desse modo, ele é utilizado como uma importante ferramenta para entender as bases biológicas da emocionalidade, da aprendizagem e memória emocional.

O LCE consiste em um aparato elevado do chão com quatro braços posicionados em direções opostas, dois fechados e dois abertos (posicionados perpendicularmente, Figura 2). Neste aparato são avaliadas variáveis espaço-temporais e etológicas. Os índices primários de ansiedade avaliados nesse modelo são as medidas espaço-temporais que se relacionam com a frequência de entradas nos braços abertos do aparato (EA) e a quantidade de tempo gasto nessas áreas aversivas (TA, RODGERS e JOHNSON, 1995), e no tempo e número de entradas nos braços fechados (TF, EF), este último é representativo da atividade locomotora do animal (CRUZ *et al.*, 1994).

As “Entradas” e “Saídas” dos braços consistem na colocação das quatro patas do animal dentro ou fora de um braço, respectivamente. De modo geral sabe-se que os animais evitam os espaços abertos do labirinto, já que os mesmos provocam medo (comportamento de esquiva) (RODGERS E DALVI, 1997). Sabe-se também que os animais exibem uma natural preferência pelos braços fechados do labirinto e drogas que aumentam as entradas dos animais nos espaços abertos são consideradas ansiolíticas. É bem estabelecido pela literatura que ansiolíticos clássicos são capazes de aumentar essa exploração dos braços abertos, sem interferir com a atividade motora (PELLOW *et al.*, 1985). Contrariamente, drogas que diminuem as entradas nos braços abertos do aparato são caracteristicamente ansiogênicas (CAROBREZ e BERTOGLIO, 2005).

Outras variáveis espaço-temporais avaliadas são a porcentagem de entrada nos braços abertos (%EA) e a porcentagem de tempo de permanência nos braços abertos (%TA), e são variáveis que se relacionam diretamente com os índices de ansiedade do animal no labirinto (RODGERS *et al.*, 1997). Juntamente com as variáveis espaço-temporais, são bem estabelecidas e avaliadas as variáveis etológicas, que são aquelas que compreendem comportamentos típicos

da espécie (SETEM *et al.*, 1999; RODGERS e JOHNSON, 1995; RODGERS *et al.*, 1999).

As principais variáveis etológicas avaliadas relacionadas à ansiedade são SAP (do inglês, “stretched attend postures”) que se caracteriza pelo movimento no qual o animal estica o corpo, projetando as patas dianteiras para a frente, explora o ambiente somente com a cabeça e retoma a posição inicial e imersão de cabeça que é o movimento exploratório de cabeça/ombros sobre a borda lateral dos braços abertos em direção ao chão (RODGERS *et al.*, 1999; RODGERS *et al.*, 1997, RODGERS E DALVI, 1997).

Também são avaliadas a exploração vertical (movimento vertical no qual o animal mantém seu corpo erguido somente pelas patas traseiras) e auto-limpeza (ato de limpar qualquer parte da superfície corporal com a língua, dentes e/ou patas dianteiras) (RODGERS *et al.*, 1999; RODGERS *et al.*, 1997, CRUZ, *et al.*, 1994, RODGERS E DALVI, 1997). Sabe-se que a redução do comportamento tipo SAP e um aumento de imersão de cabeça categorizam uma resposta ansiolítica no LCE (RODGERS *et al.*, 1997).



Figura 2. Fotografia do Labirinto em Cruz Elevado, usado nos experimentos.

1.3 Caixa de Ingestão

A caixa de ingestão consiste em um espaço utilizado para avaliar os comportamentos ingestivos e não ingestivos dos animais (Figura 3), onde o animal é exposto por um período determinado para deambular livremente pela mesma que contém em seu interior apenas água e alimento previamente pesados. Este período em que o animal deambula pela caixa é filmado para posterior avaliação dos comportamentos ingestivos e não ingestivos. Este aparato tem sido amplamente utilizado por nosso laboratório (DA CUNHA *et al.*, 2008 a; LOPES *et al.*, 2007 e 2012; KOCHENBORGER *et al.*, 2012).

Uma ampla gama de comportamentos é avaliada na caixa de ingestão: exploração do alimento (o animal manipula e cheira o alimento, mas não o ingere), ingestão alimentar (quando o animal mastiga o alimento ingerindo-o). Desse último comportamento é comumente avaliada a frequência (número de vezes que o animal ingere o alimento), latência (período que o animal leva para iniciar a ingestão do alimento) e a duração (tempo que o animal permanece comendo), comportamentos estes que se relacionam com saciação (finalização da refeição) e saciedade (inibição da alimentação após a refeição, caracteriza o intervalo entre as refeições) (HALFORD *et al.*, 1998; SETEM *et al.*, 1999).

Outros comportamentos caracterizados como não ingestivos também são avaliados na caixa de ingestão, como exploração vertical (movimento vertical no qual o animal mantém seu corpo erguido somente pelas patas traseiras), exploração não locomotora (ENL, o animal explora o ambiente movendo a cabeça sem mover as patas), locomoção (animal deambula pela caixa movendo-se completamente com as quatro patas), imobilidade (animal fica parado na mesma posição completamente imóvel), auto-limpeza (o animal limpa qualquer parte da superfície corporal com a língua, dentes e/ou patas dianteiras) (HALFORD *et al.*, 1998).

A variável SAP, intimamente relacionada com comportamentos de ansiedade e bem caracterizada pela literatura no LCE (RODGERS *et al.*, 1999; RODGERS *et al.*, 1997), também é avaliada na caixa de ingestão e está diretamente relacionada com o nível de ansiedade do

animal neste espaço (variável esta modificada do LCE para a caixa de ingestão, seguindo definição de CRUZ (1994).



Figura 3. Fotografia da Caixa de registro dos comportamentos ingestivos e não ingestivos usada nos experimentos.

1.4 Sistema Canabinóide

1.4.1 Endocanabinóides

O componente psicoativo da *Cannabis sativa*, o Δ^9 -THC (Delta-9-tetra-hidrocanabinol), foi isolado há mais de quarenta anos por MECHOULAM *et al.*, (1967), e os receptores canabinóides foram somente algumas décadas depois caracterizados, recebendo a denominação de receptores CB1 (DI MARZO, 2009). Os receptores CB1 são vastamente expressos no encéfalo, em áreas como hipocampo, córtex, substantia nigra, globo pálido, cerebelo e nAcb (SUGIURA, *et al.*, 2006; TSOU *et al.*, 1998). Assim como os

receptores CB₁, receptores CB₂ são bem descritos, porém estes são expressos no sistema imunológico, participando da regulação das respostas imunes e inflamatórias (SUGIURA, *et al.*, 2006).

Os endocanabinóides (eCBs), que são os ligantes endógenos dos receptores CB₁, representam uma classe de moléculas lipídicas, sendo eles a anandamida (N-araquidoniletanolamina; AEA), primeiro canabinóide endógeno descoberto na década de 90 (DEVANE *et al.*, 1992), e o 2-araquidonilglicerol (2-AG), (SUGIURA *et al.*, 1995).

Uma ampla variedade de estímulos, como a despolarização da membrana, estimulação do receptor, aumento do Cálcio intracelular, podem desencadear a clivagem de fosfolipídios membranares e eventualmente a síntese canabinóide (PAGOTTO *et al.*, 2006).

Quando produzidos, os eCBs são imediatamente liberados na fenda sináptica por um processo que não envolve estocagem em vesículas nem exocitose, através de uma sinalização retrógrada (Figura 4), podendo exercer seus efeitos através de receptores canabinóides CB₁ e CB₂, os quais estão acoplados a proteína G (PIOMELLI *et al.*, 2000), ou através de receptores do tipo TRPV1 (Receptor de Potencial Transiente Vanilóide 1), também denominado receptor canabinóide ionotrópico (WITKIN *et al.*, 2005; PIOMELLI *et al.*, 2000).

A síntese da anandamida ocorre primeiramente pela síntese do precursor, a N-arachidonoilfosfatidiletanolamina (NAPE), que é catalizada pela enzima N-aciltransferase; posteriormente à clivagem da NAPE, catalizada pela fosfolipase D, para a então obtenção da anandamida. O 2-AG também passa por um processo enzimático para sua síntese; a clivagem do fosfatidilinositol (PI) para se obter o 1,2-diacylglicerol (DAG), catalisada por uma fosfolipase como a fosfolipase C (PLC), e subsequentemente a conversão da DAG para 2-AG, catalisada por diacylglicerol lipase (DGL), desta forma então promovendo a síntese dos dois endocanabinóides (PIOMELLI *et al.*, 2003).

Quando liberados, a atividade dos eCBs na fenda sináptica é determinada por um sistema de captação celular, eles podem ser internalizados pelos neurônios por meio de um transporte com mecanismo de alta afinidade, chamado de transportador canabinóide. Quando internalizados, os eCBs podem passar por um processo de degradação por hidrólise por meio de enzimas específicas, sendo a

anandamida degradada através da enzima Amido Hidrolase de Ácidos Graxos (FAAH), formando então o ácido araquidônico e a etanolamina e o 2-AG degradado pela Monoacilglicerol Lipase (MGL) (PIOMELLI *et al.*, 2003). Portanto, a sinalização canabinóide é limitada por eficientes processos de degradação que envolvem sua difusão para dentro da célula e seu catabolismo enzimático específico (PAGOTTO *et al.*, 2006).

Os endocanabinóides regulam amplamente diversas funções cerebrais, as quais estão envolvidas em respostas fisiológicas e comportamentais de estresse, emocionalidade, antinocicepção, atividade metabólica, adicção, ingestão alimentar, entre outras (AMERI, 1999; RIEBE e WOTJAK, 2011; SAITO *et al.*, 2010; MCLAUGHLIN e GOBB, 2011; DI MARZO *et al.*, 2009; COTA *et al.*, 2003).

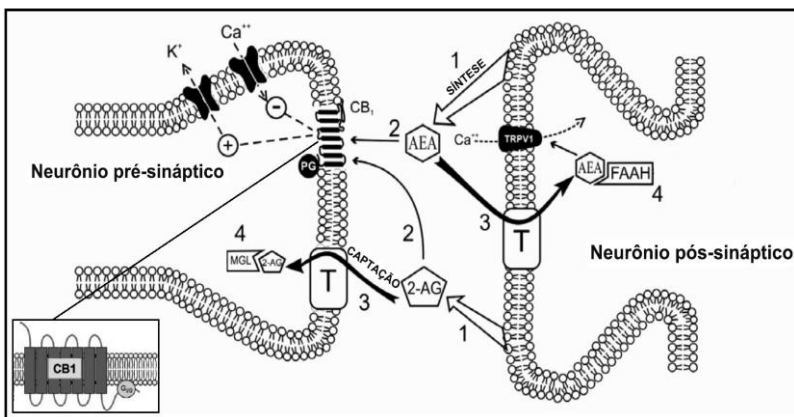


Figura 4. Representação esquemática do sistema canabinóide e sua sinalização retrógrada. No centro da figura estão representados os Endocanabinóides (AEA e 2-AG). 1-Síntese, 2-Ligação dos eCBs ao receptor CB1, 3-Transporte para dentro da célula (os transportadores estão representados pela letra T) e 4-Degradação pelas enzimas específicas (MGL e FAAH). Extraído e adaptado de SAITO *et al.*, 2010 e PAGOTTO, *et al.*, 2006.

1.4.2 Canabinóides e Ansiedade

Os Endocanabinóides modulam diferentemente uma série de respostas relacionadas à emocionalidade, memória e ansiedade (RUEDA-OROZCO *et al.*, 2008; RIBEIRO *et al.*, 2009; RUTKOWSKA *et al.*, 2006). Manipulações farmacológicas que aumentam a atividade dos eCBs, seja pela ativação dos receptores CB₁, pela inibição da enzima FAAH ou inibição da captação neuronal, induzem efeito ansiolítico em modelos animais de ansiedade, tais como o LCE (BORTOLATO *et al.*, 2006; PATEL e HILLARD, 2006; BRAIDA *et al.*, 2007; NAIDU *et al.*, 2007; MOISE *et al.*, 2008; MOREIRA *et al.*, 2008; NADERI *et al.*, 2008; MICALÉ *et al.*, 2009; BUSQUETS-GARCIA *et al.*, 2011; RIBEIRO *et al.*, 2009; RUBINO *et al.*, 2007) e caixa claro/escuro (RUTKOWSKA *et al.*, 2006; SCHERMA *et al.*, 2008).

Normalmente, baixas doses de eCBs são ansiolíticas, enquanto que doses mais elevadas tendem a ser ansiogênicas (MOREIRA e WOTJAK, 2010). Testes pré-clínicos de ansiedade demonstram que a administração sistêmica de antagonistas dos receptores CB₁ pode induzir efeito do tipo ansiolítico (SINK *et al.*, 2010; GRIEBEL *et al.*, 2005), ansiogênico (THIEMANN *et al.*, 2009; NAVARRO *et al.*, 1997) ou pode não apresentar efeito algum (ADAMCZYK *et al.*, 2008). Por outro lado, estudos clínicos mostram que o bloqueio crônico dos receptores eCBs eleva o índice de ansiedade e depressão em indivíduos sem história prévia de doenças mentais (NISSEN *et al.*, 2008; HILL e GORZALKA, 2009).

Estudos envolvendo a microinjeção local de drogas que alteram a atividade dos eCBs revelam que a amígdala, hipocampo (ventral e dorsal), substância cinzenta periaquedutal dorsolateral (dIPAG) e córtex pré-frontal representam sítios onde os eCBs podem modular o nível de ansiedade (MOREIRA *et al.*, 2007; CAMPOS *et al.*, 2010; ROOHBAKHSH *et al.*, 2007 e 2009; RUBINO *et al.*, 2008).

Sabe-se, por exemplo, que a microinjeção de AM404 ((N-(4-Hidroxifenil)-5Z,8Z,11Z,14Z-eicosatetraenamida, um inibidor da captação de anandamida) no hipocampo ventral se mostrou ansiogênica em ratos não-estressados e ansiolítica em ratos estressados, mostrando que o estresse pode ser um fator determinante

no efeito induzido pelos eCBs (CAMPOS et al, 2010). Já a microinjeção de um inibidor da enzima FAAH no hipocampo ventral de ratos foi ansiogênica (ROOHBAKHSH *et al.*, 2009) e a microinjeção de Δ^9 -THC (o princípio ativo da maconha), foi ansiolítica em ratos (RUBINO *et al.*, 2008).

No caso do hipocampo dorsal, a microinjeção de AM251((*N*-(Piperidina-1-yl)-5-(4-iodofenil)-1-(2,4-diclorofenil)-4-metil-1*H*-pirazol-3-carboxamida, um antagonista dos receptores CB₁) foi ansiolítica em ratos (ROOHBAKHSH *et al.*, 2007).

Na dIPAG, o aumento da atividade dos eCBs pela microinjeção de Anandamida (agonista CB₁), AM404 (inibidor da captação de anandamida) e URB597 (Ácido Ciclohexil Carbônico 3'-(Amino Carbonil)-[1,1'-bifenil]-3-yl ester, inibidor da enzima FAAH) induziu efeito ansiolítico no teste de ansiedade de Vogel, efeito esse bloqueado por AM251 (LISBOA *et al.*, 2008; MOREIRA *et al.*, 2007). Na dIPAG, ACEA, agonista CB₁, também apresentou efeito ansiolítico no LCE (MOREIRA *et al.*, 2007).

Na amígdala basolateral, a microinjeção de baixas doses de Δ^9 -THC foi ansiogênica, enquanto que a microinjeção de doses mais elevadas não promoveu efeito em ratos testados no LCE (RUBINO *et al.*, 2008). Na amígdala central, a microinjeção de ACPA ((*N*-(Ciclopropil)-5*Z*,8*Z*,11*Z*,14*Z*-eicosatetraenamida, agonista CB₁) foi ansiolítica em ratos testados no LCE (ZARRINDAST *et al.*, 2008) e a microinjeção de Δ^9 -THC no córtex pré-frontal foi também ansiolítica no LCE (RUBINO *et al.*, 2008).

Entretanto, apesar da presença de receptores do tipo CB₁ no nAcb (TSOU *et al.*, 1998), a literatura não dispõe de estudos avaliando o seu papel sobre os comportamentos do tipo ansiedade em ratos. Assim, o objetivo do experimento 1 do nosso trabalho foi avaliar o efeito da microinjeção de agonista CB₁ na cnAcb sobre a emocionalidade de ratos no LCE.

1.4.3 Canabinóides e Ingestão alimentar

Além de amplamente descritos na literatura pela sua participação na emocionalidade e ansiedade, os eCBs também são importantes na regulação do balanço energético e peso corporal (QUARTA *et al.*, 2011; ANDRÉ e GONTHIER, 2010; BERMUDEZ-SILVA *et al.*, 2010), mediante a modulação dos aspectos homeostáticos e hedônicos da ingestão de alimento (DI MARZO *et al.*, 2009). Receptores CB₁ são encontrados em áreas do sistema nervoso relacionadas com o controle da ingestão de alimento, tais como o hipotálamo (HERKENHAM *et al.*, 1990) e nAcb (TSOU *et al.*, 1998) e sabe-se que os eCBs têm uma relevância substancial para a ingestão de alimentos, uma vez que animais knockout para o receptor CB₁ apresentam redução na ingestão de alimentos e peso reduzido (COTA *et al.*, 2003).

Tem sido demonstrado na literatura que os eCBs (anandamida e 2-AG) e canabinóides exógenos como o Δ^9 -THC aumentam a ingestão de alimento (WILLIAMS e KIRKHAM, 1999; WILLIAMS *et al.*, 1998; HO *et al.*, 2007; KOCH e MATTHEWS, 2001). A administração de agonistas CB₁, central (MERROUN *et al.*, 2009) e sistêmica (GÓMEZ *et al.*, 2002) induziu efeito hiperfágico em ratos pré-saciados (24h de privação alimentar e acesso à comida previamente ao experimento). Já a administração sistêmica (GÓMEZ *et al.*, 2002) e central (i.c.v.; MERROUN *et al.*, 2009) de antagonistas CB₁ induziu efeito hipofágico em ratos pré-saciados.

O efeito hiperfágico induzido por agonistas eCBs parece ser mediado pela ativação de receptores CB₁ localizados no hipotálamo, visto que a microinjeção de anandamida no hipotálamo ventromedial induziu hiperfagia em ratos (JAMSHIDI e TAYLOR, 2001). No mesmo sentido, a microinjeção de Δ^9 -THC no hipotálamo aumentou a ingestão de alimento, efeito esse bloqueado por rimonabant, um antagonista dos receptores CB₁ (VERTY *et al.*, 2005).

Sabe-se que o aumento da ingestão de alimentos induzido por agonistas de receptores CB₁ parece envolver componentes específico da dieta, tais como carboidratos (ESCARTÍN-PÉREZ *et al.*, 2009). Também tem sido proposto que eCBs hipotalâmicos podem ativar

tonicamente os receptores CB₁ para manter a ingestão de alimento em condições de restrição alimentar (DI MARZO *et al.*, 2001).

Em relação ao nAcb, a participação de eCBs sobre a ingestão de alimento tem um papel bem estabelecido. As repostas já obtidas com canabinóides na cnAcb, com a utilização de agonistas CB₁, demonstram geralmente hiperfagia, como por exemplo a microinjeção de drogas que aumentam a atividade dos eCBs na cnAcb, tais como AA5HT (*N*-araquidonoil-serotonina, inibidor da enzima FAAH) e OMDM-1 ((*R*)-*N*-oleoil-(10-hidroxibenzil)-20-etanol amina, inibidor da captação de anandamida) induziram hiperfagia em ratos saciados, que foi bloqueada pela co-administração de AM251 (SORIA-GÓMEZ *et al.*, 2007), a administração de Oleamida (molécula canabimimética) também promove hiperfagia e sua combinação com AM251 por sua vez também reduz a ingestão alimentar (SORIA-GÓMEZ *et al.*, 2010).

Com a utilização de ração padrão em ratos saciados, agonistas CB₁ também promoveram efeitos hiperfágicos no Acb (CORTÉS-SALAZAR *et al.*, 2014) e a microinjeção de ACEA, promoveu hiperfagia em ratos restritos, num protocolo com ração de elevado valor hedônico (CORTÉS-SALAZAR *et al.*, 2012). A microinjeção de anandamida na cnAcb também induziu hiperfagia (KIRKHAM *et al.*, 2002; MAHLER *et al.*, 2007) e aumento do impacto reforçador de sacarose intra-oral, sem alterar o impacto aversivo de quinina intra-oral em ratos saciados, indicando que a ativação dos receptores CB₁ na cnAcb aumenta o consumo de alimento favorecendo o consumo de componentes nutricionais de elevado valor hedônico (MAHLER *et al.*, 2007; ESCARTÍN-PÉREZ *et al.*, 2009); assim, os eCBs no nAcb parecem ser importantes no direcionamento do apetite para alimentos mais palatáveis, determinando o grau de ingestão calórica (HARROLD *et al.*, 2002) e contribuindo para a ocorrência de distúrbios de obesidade (MATIAS *et al.*, 2006; HARROLD *et al.*, 2002).

Também tem sido proposto que o aumento da ingestão de alimento induzido pelo aumento da atividade de eCBs na cnAcb pode envolver a ativação de núcleos hipotalâmicos (SORIA-GÓMEZ *et al.*, 2007), já que os receptores CB₁ no Acb parecem modular a liberação de mediadores hipotalâmicos (capazes de inibir ou estimular a

ingestão de alimento) e de dopamina na cnAcb, (DI MARZO *et al.*, 2009; PAGOTTO *et al.*, 2005).

Percebe-se que os estudos envolvendo a participação dos eCBs na cnAcb sobre a ingestão de alimento utilizaram ratos saciados e/ou ingestão de alimento de alto valor hedônico. A literatura não dispõe de estudos avaliando o papel dos eCBs no nAcb sobre a ingestão de alimento padrão em estados nutricionais, tal como privação de alimento de 24 horas. Nesse sentido, os poucos estudos disponíveis utilizando animais privados de alimentação por 24h, se utilizaram de administrações sistêmicas de drogas, demonstrando que um agonista dos receptores CB₁ (ESCARTÍN-PÉREZ *et al.*, 2009) e Δ^9 -THC (WILEY *et al.*, 2005) induziu hiperfagia, enquanto que um antagonista dos receptores CB₁ induziu hipofagia (RIEDEL *et al.*, 2009; WILEY *et al.*, 2005).

Assim, o experimento 2 do nosso trabalho teve como objetivo avaliar o efeito da microinjeção de um agonista e antagonista dos receptores CB₁ na cnAcb sobre a ingestão de alimento em ratos em uma situação nutricional de privação alimentar de 24 horas.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Estudar a participação de receptores canabinóides do tipo CB₁ na cnAcb sobre respostas comportamentais relacionadas à ansiedade de ratos saciados no LCE, bem como sobre o comportamento ingestivo de ratos privados de alimento.

2.2. Objetivos Específicos

- Estabelecer uma curva dose-resposta da microinjeção de ACEA (agonista CB₁) na cnAcb sobre comportamentos relacionados à ansiedade de ratos saciados no labirinto em cruz elevado.
- Avaliar os efeitos da microinjeção de ACEA no ventrículo lateral sobre comportamentos relacionados à ansiedade de ratos saciados no labirinto em cruz elevado, verificando a hipótese de dispersão da droga devido sua proximidade anatômica com o nAcb.
- Estabelecer uma curva dose-resposta da microinjeção de ACEA na cnAcb, nas mesmas doses utilizadas no teste do LCE, sobre a ingestão de alimento em ratos submetidos a um protocolo de privação alimentar.
- Avaliar o efeito do bloqueio dos receptores CB₁, com o antagonista AM251, sobre a ingestão de alimento em ratos submetidos a privação alimentar.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Ratos (*Rattus norvegicus*) Wistar machos, pesando entre 280 e 300g, foram utilizados como sujeitos experimentais. Os animais foram fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina e mantidos em grupos de cinco em caixas de polipropileno (49 x 34 x 16cm) forradas com maravalha. Antes dos experimentos os animais foram submetidos a 7 dias de adaptação ao biotério do laboratório com livre acesso à água e ração (CR-1, Nuvilab), sob temperatura de $21 \pm 2^{\circ}\text{C}$ e ciclo claro/escuro de 12 horas (luzes acendendo às 06:00h). Os animais foram manipulados apenas para limpeza das caixas (a cada 48 horas), pesagem e administração de drogas. Os experimentos foram realizados no período vespertino (13:00-16:00h) com o observador fora da sala de experimentação.

Todos os procedimentos realizados foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética ao Uso de Animais (CEUA) (PP00724) da Universidade Federal de Santa Catarina (em anexo).

3.2 Drogas

Os animais receberam microinjeções de ACEA (Araquidonoil-2-Cloroetilamida, um agonista de receptores canabinóides tipo 1) (Tocris; doses de 0,005, 0,05, 0,5 pmol) dissolvida em etanol (0,04%) em solução salina (0,9%) e o grupo controle ou veículo (VEH), recebeu etanol (0,04%) em solução salina (NaCl) 0,9%. Os animais também foram tratados com AM251 ((*N*-(Piperidina-1-yl)-5-(4-iodofenil)-1-(2,4-diclorofenil)-4-metil-1*H*-pirazol-3-carboxamida) (Tocris; doses de 100 e 10 pmol) dissolvido em salina (NaCl) 0.9% com 2% de etanol e o grupo controle ou veículo (VEH), recebeu salina (NaCl) 0.9% com 2% de etanol. A

injeção das drogas e dos respectivos veículos foi realizada por meio de uma agulha injetora (Mizzy-Slide-Park; 0,3 mm de diâmetro), introduzida na cânula-guia e conectada por um tubo de polietileno a uma microseringa Hamilton (capacidade de 1 μ l). Seu tamanho excedeu ao da cânula-guia em 2,0 mm. A cânula não foi introduzida exatamente até o núcleo no dia da cirurgia, visando minimizar lesões prévias ao experimento, sendo o núcleo lesionado apenas pela microinjeção 7 dias após a cirurgia. Com o objetivo de minimizar variações na pressão intracerebral, as soluções foram administradas no período de 1 min., sendo o volume injetado de 200 nl (0,2 μ l). As doses de ACEA e AM251 foram escolhidas de acordo com faixa de doses já descritas na literatura (MOREIRA *et al.*, 2007).

3.3 Implantação unilateral de cânulas-guia no Accumbens

Para implantação das cânulas-guia na *cnAcb*, os ratos foram anestesiados com uma mistura de Ketamina (87 mg.kg⁻¹) e Xilasina (13 mg.kg⁻¹) por via i.p. e, em seguida, foram adaptados ao aparelho estereotáxico (Figura 5). As coordenadas para a implantação das cânulas-guia na *cnAcb* foram derivadas do atlas estereotáxico para cérebro de ratos (PAXINOS e WATSON, 2007. AP + 0,15mm, L+ 0,10 e DV – 0,57 mm). As cânulas-guia foram confeccionadas a partir de agulhas hipodérmicas, com 0,7 mm de diâmetro externo e 17 mm de comprimento. Na região de acesso cirúrgico na cabeça, após assepsia com álcool iodado, uma incisão longitudinal foi realizada no escalpo, de forma a expor a calota craniana. A porção exposta do crânio foi cuidadosamente raspada e seca para garantir a adesão do acrílico. Em seguida foi marcada a posição para a perfuração e implantação das cânulas-guia (unilateralmente) de acordo com o bregma. Para perfuração da calota craniana e formação de um orifício, por onde foi introduzida a cânula-guia, utilizou-se uma broca esférica de uso odontológico. Cada cânula foi fixada à calota craniana por meio de um parafuso de joalheiro posicionado no canto oposto à sua posição, de modo a oferecer uma fixação eficaz da mesma e no mesmo tamanho da cânula foi inserido dentro dela um fio ortodôntico

para obstrução da cânula até o dia do experimento, evitando assim o entupimento da mesma, sendo por fim esse conjunto envolvido por acrílico autopolimerizável, formando uma estrutura sólida capaz de resistir aos eventuais choques mecânicos com a gaiola, deste modo permitindo uma completa fixação da cânula até o dia do experimento. Feito isso o animal foi colocado em caixa individual e teve o corpo coberto com maravalha com o intuito de aquecê-lo após o procedimento, então retornou ao biotério e foi mantido com água e ração *ad libitum* até o dia do experimento (para os animais que passaram pelo teste do LCE e para os animais que passaram pelo teste de ingestão alimentar, ficaram com água e ração *ad libitum* até o dia que antecedia o experimento, ficando posteriormente privados de alimento até o dia do teste).

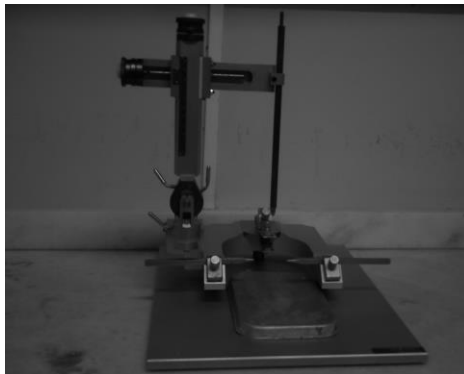


Figura 5. Fotografia do aparelho estereotáxico utilizado nos procedimentos cirúrgicos.

3.4 Implantação de cânulas-guia no Ventrículo Lateral

Para implantação das cânulas-guia no ventrículo lateral (VL), os animais passaram pelo mesmo protocolo descrito no item 3.3. As coordenadas para a implantação da cânula-guia no ventrículo lateral

foram também derivadas do atlas estereotático para cérebro de ratos (PAXINOS e WATSON, 2007. AP + 0,08mm, L+ 0,15 e DV – 0,30 mm). As cânulas-guia foram confeccionadas a partir de agulhas hipodérmicas, com 0,7 mm de diâmetro externo e 13 mm de comprimento. Um manômetro contendo salina auxiliou na localização da cavidade ventricular. Esse manômetro consiste de um tubo de vidro em forma de U, situado ao lado e acima do estereotático, conectado à cânula guia por meio de um tubo longo de polietileno. Esse sistema, contendo solução salina 0,9%, forma uma coluna de líquido cujo menisco poderá ser visualizado através do vidro. O deslocamento do menisco indicará quando a cânula-guia atingir a luz do ventrículo lateral. Após o procedimento cirúrgico os animais retornaram ao biotério e foram mantidos com água e ração *ad libitum* até o dia do experimento.

3.5 Testes

3.5.1 *Teste do Labirinto em Cruz Elevado (LCE)*

O LCE utilizado é constituído de duas passarelas de madeira, perpendiculares, formando uma cruz simétrica (quatro braços de 50cm de comprimento por 10cm de largura) com um quadrante central de 10X10cm, na junção entre os quatro braços. Dois braços opostos são fechados por paredes laterais de vidro fumê de 40cm de altura, enquanto os braços restantes são abertos, circundados por uma borda de 1cm de acrílico transparente para reduzir a ocorrência de quedas. O labirinto é elevado a 50cm do solo e, quatro lâmpadas fluorescentes (15W cada), dispostas igualmente em forma de cruz, 100 cm acima do labirinto, são utilizadas como única fonte de iluminação. Cada teste teve início com a colocação do animal no quadrante central do labirinto, com a face voltada para um dos braços fechados, permanecendo em livre exploração por 5 minutos. Cada teste foi

filmado por uma câmera digital para posterior registro das variáveis comportamentais, com o auxílio do Programa Etholog 2.25 (OTTONI, 2000). As variáveis comportamentais foram expressas como média e erro padrão da média e divididas em espaço-temporais e etológicas. Com o objetivo de evitar pistas odoríferas, após cada teste, o labirinto foi limpo com tecido umedecido em solução alcoólica 20%.

3.5.2 Teste de Ingestão alimentar

O teste da ingestão alimentar consiste em uma caixa de polipropileno (49 x 34 x 16cm) com três paredes escuras e uma transparente, onde pelo lado de fora da parede transparente há um espelho posicionado à 45° de modo que o animal não consiga se visualizar no mesmo, mas permitindo ao observador uma melhor visualização dos comportamentos do animal no vídeo para posterior transcrição (Figura 3). A webcam é acoplada acima da caixa. Dentro da caixa há água e uma quantidade de ração previamente pesada, onde o animal explora esse ambiente livremente por 30 minutos. Previamente à avaliação da ingestão alimentar no dia do experimento, cada animal foi submetido a um período de adaptação à caixa teste por 30 minutos, durante os 2 dias consecutivos anteriores ao dia do experimento, estando os mesmos saciados. Para a avaliação da ingestão de alimento (dia 3), cada animal foi privado de ração por 24h antes do teste em si, conforme WILEY e colaboradores (2005).

A avaliação da ingestão de alimento foi feita imediatamente após a microinjeção das drogas. Ao final do teste, a ração restante na caixa experimental foi pesada e o consumo de alimento foi avaliado pela diferença entre a quantidade inicial e final de ração. Com o objetivo de evitar pistas odoríferas, após cada teste, a caixa experimental foi limpa com tecido umedecido em solução alcoólica 20%. Durante o teste, o comportamento do animal foi filmado por uma câmera digital. As filmagens foram posteriormente analisadas com o auxílio do programa Etholog 2.25 (OTTONI, 2000).

3.6 Procedimentos Experimentais

3.6.1 Experimento 1.

Visando estabelecer uma curva dose resposta do agonista CB1, ACEA, e seus efeitos sobre comportamentos relacionados à ansiedade, um grupo de 38 animais recebeu implantação unilateral de cânula guia na cnAcb, como descrito no item 3.3. e após 7 dias de recuperação cirúrgica, cada animal recebeu uma microinjeção de ACEA ou VEH, (ACEA 0,005 pmol, n=10; ACEA 0,05 pmol, n=9; ACEA 0,5 pmol, n=8 e VEH, n=11) e foram posteriormente testados no LCE (item 3.5.1). Após a obtenção dos resultados no LCE, 13 animais receberam a cânula guia no Ventrículo Lateral conforme descrito no item 3.4 (ACEA 0,05 pmol, n=7 e VEH, n=6). O objetivo desse experimento foi checar se alguma alteração comportamental poderia ser decorrente da dispersão da droga do local de microinjeção (no caso, a cnAcb) para o Ventrículo Lateral. Foi utilizada a dose efetiva, na cnAcb que alterou o comportamento dos animais no LCE, no VL. Após 7 dias de recuperação cirúrgica, foram testados no LCE como descrito no item 3.5.1.

3.6.2 Experimento 2.

Para avaliar as mesmas doses do agonista ACEA utilizadas no teste do LCE, num protocolo de ingestão alimentar, um grupo de 43 animais recebeu implantação unilateral de cânula guia na cnAcb, como descrito no item 3.3. e após 7 dias de recuperação cirúrgica, cada animal foi ambientado durante dois dias anteriores ao

experimento. 24 horas antes do experimento os animais foram privados de alimento e no dia seguinte cada animal recebeu uma microinjeção de ACEA ou VEH, (ACEA 0,005 pmol, n=12; ACEA 0,05 pmol, n=12; ACEA 0,5 pmol, n=10 e VEH, n=9) e foram posteriormente submetidos ao teste de ingestão alimentar (conforme descrito no item 3.5.2).

3.6.3 Experimento 3.

Para avaliar o efeito do bloqueio dos receptores CB1 na cnAcb, um grupo de 23 animais recebeu implantação unilateral de cânula guia na cnAcb, como descrito no item 3.3. e após 7 dias de recuperação cirúrgica, cada animal foi ambientado durante dois dias anteriores ao experimento. 24 horas antes do experimento os animais foram privados de alimento e no dia seguinte cada animal recebeu uma microinjeção de AM251 ou VEH, (AM251 10pmol, n=6; AM251 100pmol, n=10 e VEH, n=7), e foram posteriormente submetidos ao mesmo teste de ingestão alimentar que o grupo com o agonista (conforme descrito no item 3.5.2)

3.7 Histologia

Ao final dos experimentos, os ratos com cânulas implantadas unilateralmente na cnAcb foram anestesiados e perfundidos transcárdialmente com salina 0,9%, seguido de formol a 10%. O posicionamento das cânulas foi verificado por meio da injeção de 200 nl de azul de Evans. Logo após, as peças foram dissecadas e imersas por 7 dias em formol a 10%. Passado esse período, os cérebros passaram por um protocolo de fixação para crioproteção e foram então congelados e cortados com o auxílio de um criostato em fatias de 60 µm de espessura. Após a montagem em lâminas gelatinizadas os

cortes foram corados pelo método de Nissl e analisados ao microscópio. A reprodução gráfica dos cortes e dos pontos de injeção analisados ao microscópio foi realizada manualmente a partir do atlas de PAXINOS e WATSON (2007), para assim saber o exato local do posicionamento das microinjeções.

Os ratos com cânulas implantadas unilateralmente no ventrículo lateral foram anestesiados e perfundidos transcordialmente com salina 0,9%, seguido de formol a 10%. O posicionamento das cânulas foi verificado por meio da injeção de 200 nl de azul de Evans e após o encéfalo ser removido, foi cortado longitudinalmente para a observação do espalhamento do corante no ventrículo. Foram considerados somente os animais que apresentaram extravasamento do corante por toda a cavidade ventricular.

3.8 Análise Estatística

Os dados foram analisados pela análise de variância ANOVA de uma via no teste do LCE e Ingestão Alimentar (fator tratamento) e ANOVA de duas vias na relação entre dia e tratamento no teste de Ingestão Alimentar (fator dia X tratamento). Quando os efeitos principais das ANOVAs foram significantes, as mesmas foram seguidas do teste de Newman-Keuls para múltiplas comparações. Apenas valores de probabilidade menores que 5% foram considerados significantes.

3.9 Desenho Experimental

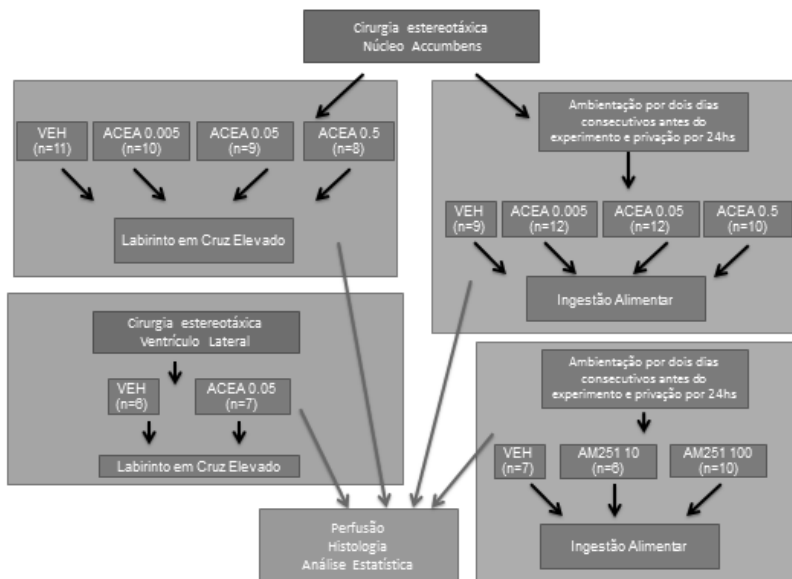


Figura 6. Desenho experimental

4. RESULTADOS

4.1 Microinjeções

A análise histológica das microinjeções mostrou que 104 animais apresentaram as microinjeções na região da cnAcb (Região rostral do Acb). Não foram incluídos na análise estatística os animais que tiveram as cânulas-guia e microinjeções em outras áreas que não fosse a região da concha do Acb devido as regiões atingidas serem muito variadas, onde não foi possível o fechamento de grupos específicos por região.

- Grupos das microinjeções de droga e veículo na região da cnAcb e doses administradas no teste do Labirinto em Cruz Elevado (Figura 7):
 - 11 animais receberam microinjeção de veículo (VEH. Etanol 0,04% em Salina 0,9%).
 - 10 animais receberam microinjeção de ACEA 0,005 pmol.
 - 9 animais receberam a microinjeção de ACEA 0,05 pmol.
 - 8 animais receberam a microinjeção de ACEA 0,5 pmol.

- Grupos das microinjeções de droga e veículo no Ventrículo Lateral e doses administradas no teste do Labirinto em Cruz Elevado:
 - 6 animais receberam microinjeção de veículo (VEH. Etanol 0,04% em Salina 0,9%).
 - 7 animais receberam microinjeção de ACEA 0,05 pmol.

➤ Grupos das microinjeções de droga e veículo na região da *cnAcb* e doses administradas no teste da Ingestão Alimentar com ACEA (Figura 8) e AM251 (Figura 9):

- 9 animais receberam microinjeção de veículo (VEH. Etanol 0,04% em Salina 0,9%).
- 12 animais receberam microinjeção de ACEA 0,005 pmol.
- 12 animais receberam a microinjeção de ACEA 0,05 pmol.
- 10 animais receberam a microinjeção de ACEA 0,5 pmol.
- 7 animais receberam microinjeção de veículo (VEH. Etanol 2% em Salina 0,9%).
- 6 animais receberam a microinjeção de AM251 10 pmol.
- 10 animais receberam a microinjeção de AM251 100 pmol.

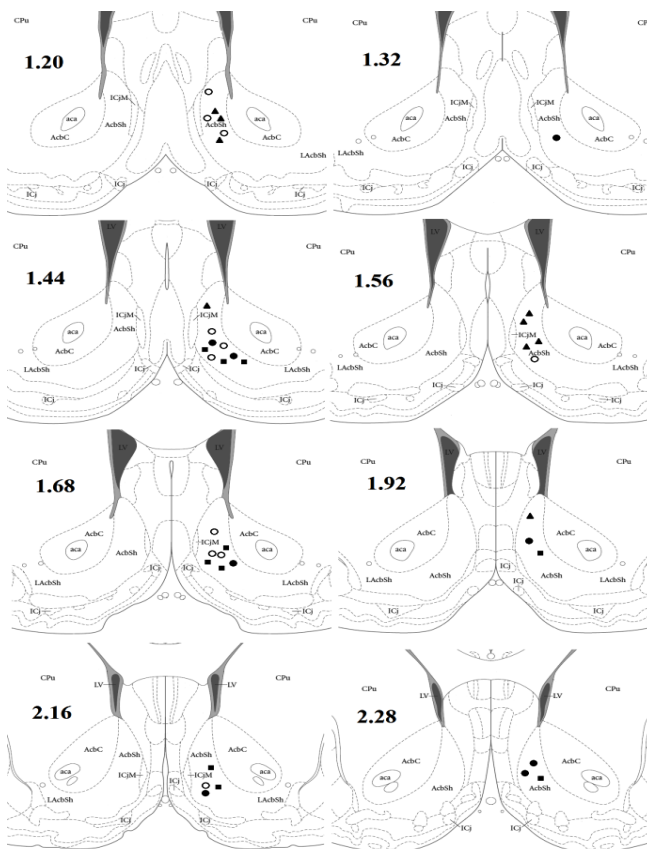


Figura 7. Distribuição das microinjeções de ACEA na região rostral da concha do Núcleo Accumbens de ratos submetidos ao teste do Labirinto em Cruz Elevado. Desenho esquemático de cortes coronais (50 μ m) do cérebro do rato de acordo com o atlas PAXINOS e WATSON (2007). As drogas foram microinjetadas nas doses de 0,005, 0,05 e 0,5 pmol/0.2 μ l: Etanol (○), ACEA 0,005 pmol (■) ACEA 0,05 pmol (▲) e ACEA 0,5 pmol (●) e posteriormente os animais foram submetidos ao LCE. Abreviações: AcbC: centro do núcleo accumbens; AcbSh: concha do núcleo accumbens; aca: comissura anterior; ICj: ilhas de Calleja; ICjM: ilhas de Calleja,

grande ilha; LAcbSh: concha lateral do accumbens; LV: ventrículo lateral, CPu: caudado putamen (estriado).

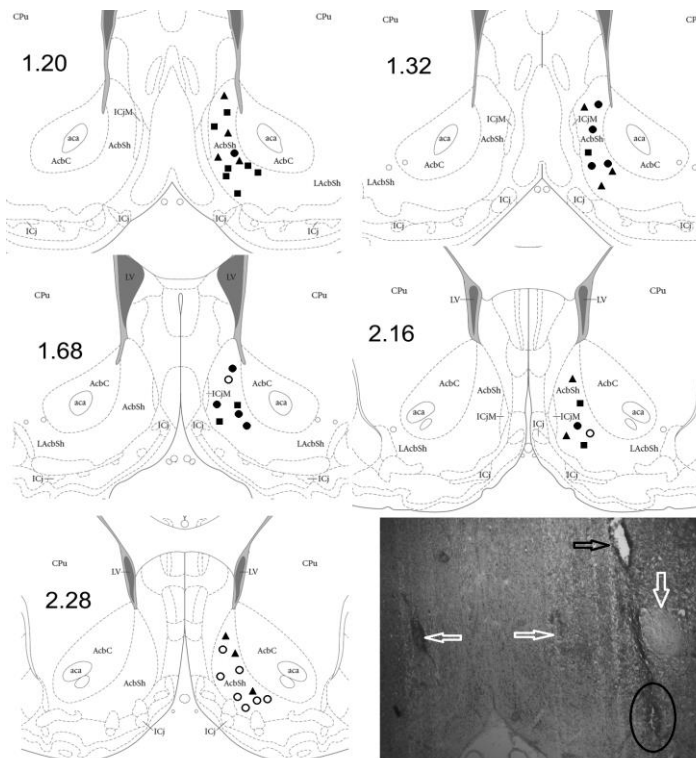


Figura 8. Distribuição das microinjeções de ACEA na região rostral da concha do Núcleo Accumbens de ratos submetidos ao teste de ingestão alimentar e fotomicrografia mostrando o local de uma microinjeção. A microinjeção está demonstrada com um círculo localizada na concha do núcleo accumbens. A seta branca maior mostra a comissura anterior, a seta preta única mostra o ventrículo lateral e as setas brancas menores mostram as ilhas de Calleja, (AP=1.20; PAXINOS e WATSON, 2007). O desenho esquemático de

cortes coronais (60 μ m) do cérebro do rato de acordo com o atlas PAXINOS e WATSON (2007) mostra os pontos de microinjeção. As drogas foram microinjetadas nas doses de 0,005, 0,05 e 0,5 pmol/0,2 μ l: Etanol (○), ACEA 0,005 pmol (■) ACEA 0,05 pmol (▲) e ACEA 0,5 pmol (●) e posteriormente os animais foram submetidos ao teste de ingestão alimentar. Abreviações: AcbC: centro do núcleo accumbens; AcbSh: concha do núcleo accumbens; aca: comissura anterior; ICj: ilhas de Calleja; ICjM: ilhas de Calleja, grande ilha; LAcbSh: concha lateral do accumbens; LV: ventrículo lateral, CPu: caudado putamen (estriado)

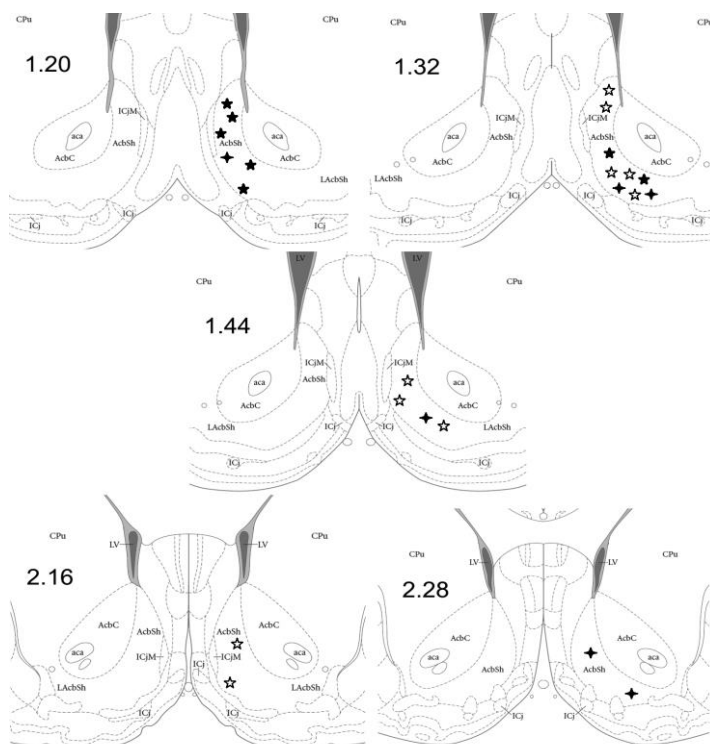


Figura 9. Posicionamento das microinjeções de AM251 na região

rostral da concha do Núcleo Accumbens de ratos submetidos ao teste de ingestão alimentar. O desenho mostra cortes coronais (60µm) do cérebro do rato, com os pontos de microinjeção de acordo com o atlas PAXINOS e WATSON (2007). As drogas foram microinjetadas nas doses de 10 e 100 pmol/0,2µl: Etanol (★), AM251 10 pmol (✦), AM251 100 pmol (☆) e posteriormente os animais foram submetidos ao teste de ingestão alimentar. Abreviações: AcbC: centro do núcleo accumbens; AcbSh: concha do núcleo accumbens; aca: comissura anterior; ICj: ilhas de Calleja; ICjM: ilhas de Calleja, grande ilha; LAcbSh: concha lateral do accumbens; LV: ventrículo lateral, CPu: caudado putamen (estriado).

4.2 Experimento 1 e 2: Teste do Labirinto em Cruz Elevado

Todos as 38 microinjeções posicionadas no nAcb, estão mostradas esquematicamente na Figura 7. As microinjeções atingiram o interior da concha do nAcb rostral (AP, 2,28-1,20), como descrito por REYNOLDS e BERRIDGE 2002. Uma fotomicrografia representa a localização de uma destas microinjeções (Figura 10).

Com relação à microinjeção de ACEA, ANOVA de uma via indicou redução da porcentagem de tempo de permanência dos animais nos braços abertos do LCE ($F_{3,34} = 3,35$; $p < 0,05$; Fig. 11A) e da porcentagem de entradas dos animais nos braços abertos do LCE ($F_{3,34} = 3,23$; $p < 0,05$; Fig. 11B). Além disso, a ANOVA também indicou um efeito principal significativo de redução das entradas dos animais nos braços abertos do LCE ($F_{3,34} = 3,84$; $p < 0,05$; Fig. 12A) e não houve nenhum efeito significativo sobre as entradas dos animais nos braços fechados do LCE ($F_{3,34} = 2,06$; $p = \text{NS}$; Fig. 12B). O teste de Newman-Keuls para múltiplas comparações revelou que a porcentagem de tempo nos braços abertos e entradas nos braços

abertos estavam diminuídos nos animais que receberam 0,05 pmol ACEA na cnAcb em comparação com o grupo microinjetado com veículo (Fig. 11A e 12A, respectivamente), porém com relação a porcentagem de entradas nos braços abertos, o teste de Newman-Keuls mostrou que 0,05 pmol ACEA, foi marginalmente significativo em comparação ao grupo controle ($p = 0,0519$). Em relação às variáveis etológicas, a ANOVA de uma via não revelou qualquer efeito significativo em relação à imersão de cabeça, SAP, autolimpeza ou exploração vertical. (Tabela 1).

A análise de variância de uma via não mostrou qualquer efeito significativo sobre as variáveis espaço-temporais e etológicas quando a dose da ACEA, que induziu um efeito angiogênico quando microinjetada na cnAcb, foi microinjetada no VL (ver tabela 2).

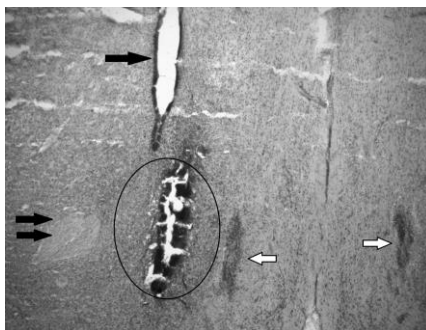


Figura 10. Fotomicrografia mostrando o local de uma microinjeção. A microinjeção está demonstrada com um círculo no local da lesão da agulha injetora, localizada na concha do núcleo accumbens. As setas pretas duplas mostram a comissura anterior, a seta preta única mostra o ventrículo lateral e as setas brancas mostram as ilhas de Calleja, (AP=1.56; PAXINOS e WATSON, 2007).

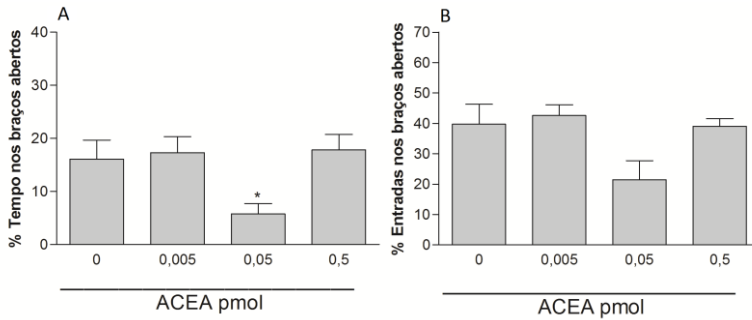


Figura 11. Representação do efeito ansiogênico induzido pela microinjeção de ACEA na concha do Núcleo Accumbens. A % de tempo nos braços abertos está representada no gráfico A e a % de entradas nos braços abertos, no gráfico B. Ratos foram unilateralmente microinjetados com ambos veículo (Etanol 0,04% em Salina 0,9%, n=11) ou ACEA nas doses de 0,005 (n=10), 0,05 (n=9) e 0,5 pmol (n=8) na concha do núcleo accumbens e subsequentemente testados no labirinto em cruz elevado. As colunas representam média \pm E.P.M. * $p < 0,05$ comparado ao grupo tratado com veículo (ANOVA de uma via seguida do teste de Newman-Keuls para múltiplas comparações).

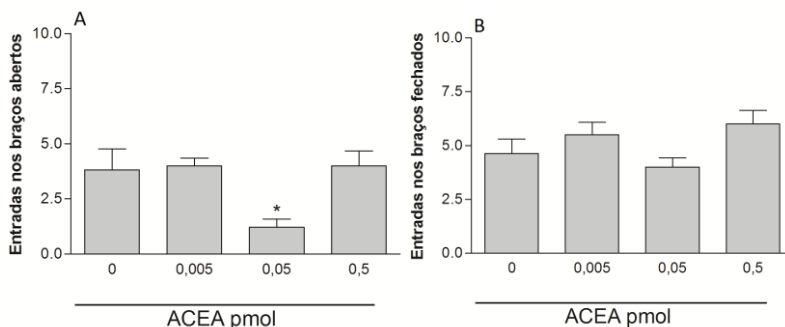


Figura 12. Número de entradas nos braços abertos e fechados do Labirinto em Cruz Elevado após a microinjeção de ACEA na concha do Núcleo Accumbens. O número de entradas nos braços abertos está representado no gráfico A enquanto o número de entradas nos braços fechados, no gráfico B. Ratos foram unilateralmente microinjetados com ambos veículo (Etanol 0,04% em Salina 0,9%, n=11) ou ACEA nas doses de 0,005 (n=10), 0,05 (n=9) e 0,5 pmol (n=8) na concha do núcleo accumbens e subsequentemente testados no labirinto em cruz elevado. As colunas representam média \pm E.P.M. *p < 0.05 comparado ao grupo tratado com veículo (ANOVA de uma via seguida do teste de Newman-Keuls para múltiplas comparações).

Tabela 1. Resultados da ANOVA de uma via mostrando os comportamentos dos ratos testados no LCE após a microinjeção com veículo ou as doses de ACEA na região da concha do núcleo Accumbens.

Variáveis	ACEA 0	ACEA 0,05	ACEA 0,005	ACEA 0,5	Efeitos da ANOVA
AL	$2,0 \pm 0,7$	$1,6 \pm 0,6$	$1,7 \pm 0,3$	$1,3 \pm 0,7$	$F_{3,34} = 0,15$; p=NS
EV	$11,8 \pm 1,6$	$11,4 \pm 1,5$	$13,2 \pm 0,7$	$13,7 \pm 0,9$	$F_{3,34} = 0,64$; p=NS
IC	$8,1 \pm 1,8$	$3,8 \pm 0,6$	$6,4 \pm 1,0$	$8,2 \pm 1,6$	$F_{3,34} = 1,96$; p=NS
SAP	$5,4 \pm 0,9$	$5,3 \pm 0,8$	$4,6 \pm 0,4$	$5,6 \pm 0,8$	$F_{3,34} = 0,32$; p=NS

Os dados foram expressos em media \pm erro padrão da média. Ratos foram microinjetados unilateralmente com veículo (Etanol 0,04% em Salina 0,9%, n=11) ou ACEA nas doses de 0,005 (n=10), 0,05 (n=9) e 0,5 pmol (n=8) (0.2 μ l) na concha do núcleo accumbens (cnAcb) e testados (5 min) no LCE. AL, Auto-Limpeza. EV, Exploração Vertical. SAP, Stretched-Attend Postures. IC, Imersão de Cabeça. NS indica não significante.

Tabela 2. Resultados da ANOVA de uma via mostrando os comportamentos dos ratos testados no Labirinto em Cruz Elevado após a microinjeção com veículo ou ACEA (0,05 pmol) no Ventrículo Lateral.

Variáveis	ACEA 0	ACEA 0,05	Efeitos da ANOVA
EF	4,6 ± 1,2	4,0 ± 1,4	F _{1,11} = 0,11; p=NS
EA	2,5 ± 0,9	2,8 ± 1,2	F _{1,11} = 0,04; p=NS
%TA	12,5 ± 4,5	12,4 ± 4,9	F _{1,11} = 0,01; p=NS
%EA	31,3 ± 11,0	32,9 ± 11,6	F _{1,11} = 0,01; p=NS
AL	2,5 ± 0,9	1,5 ± 0,7	F _{1,11} = 0,59; p=NS
EV	10,0 ± 2,1	8,7 ± 1,3	F _{1,11} = 0,26; p=NS
IC	3,1 ± 0,8	5,4 ± 1,6	F _{1,11} = 1,29; p=NS
SAP	5,3 ± 0,7	6,0 ± 0,8	F _{1,11} = 0,33; p=NS

Os dados foram expressos em media ± erro padrão da média. Ratos foram microinjetados unilateralmente com veículo (Etanol 0,04% em Salina 0,9%, n=6) ou ACEA na dose de 0,05pmol (n=7) (0,2µl) no ventrículo lateral e testados (5 min) no LCE. EF, Entradas nos Braços Fechados. EA, Entradas nos Braços Abertos. %TA, Porcentagem de Tempo nos Braços Abertos. %EA, Porcentagem de Entradas nos Braços Abertos. AL, Auto-Limpeza. EV, Exploração Vertical. IC, Imersão de Cabeça SAP, Stretched-Attend Postures. NS indica não significante.

4.3. Experimento 3: Teste de Ingestão alimentar

Todas as 43 microinjeções de ACEA atingiram o interior da *cnAcb* rostral (AP, 2,28-1,20). O desenho esquemático representando os grupos e uma fotomicrografia de uma lâmina que representa a microinjeção na região da *cnAcb*, estão representados na Figura 8.

Em relação aos resultados da microinjeção de ACEA, a análise estatística de variância ANOVA de uma via não indicou um efeito significativo sobre a quantidade de alimento ingerido ($F_{3,39} = 1,67$; $p=0,18$; Fig. 13A), duração ($F_{3,39} = 1,16$; $p=0,33$; Fig. 13B), latência ($F_{3,39} = 0,34$; $p=0,79$; Fig. 13C) e frequência ($F_{3,39} = 1,03$; $p=0,38$; Fig. 13D) da ingestão de alimentos. A ingestão de água também permaneceu inalterada com os tratamentos ($F_{3,39} = 0,48$; $p=0,69$). O tratamento com ACEA também não apresentou efeitos nos comportamentos não ingestivos como auto-limpeza ($F_{3,39} = 0,89$; $p=0,45$), exploração vertical ($F_{3,39} = 0,55$; $p=0,64$), locomoção ($F_{3,39} = 0,09$; $p=0,96$), imobilidade ($F_{3,39} = 0,73$; $p=0,53$) e SAP ($F_{3,39} = 0,51$; $p=0,67$), todos esses comportamentos estão representados na Tabela 3.

Apesar de não haver resposta sobre a ingestão alimentar em relação ao grupo controle no dia do experimento, uma resposta hiperfágica foi observada devido à restrição alimentar de 24 horas. Os animais foram ambientados dois dias antes do experimento (dias 1 e 2), foram expostos a um protocolo de privação alimentar de 24 horas e no dia 3, os ratos receberam a microinjeção das drogas. A ANOVA de duas vias indicou que em relação à variável “dia”, os ratos de todos os grupos, privados de alimento, apresentaram uma resposta de aumento de ingestão alimentar com relação aos dias anteriores em que estavam saciados ($F_{2,117} = 92,47$; $p < 0,05$), (Figura 14), porém não houve interação entre as variáveis “dia X tratamento” nem com a variável “tratamento”.

Em relação às microinjeções do antagonista AM251, não foram observados efeitos significativos com a análise de variância ANOVA de uma via. A quantidade de alimento ingerido ($F_{2,20} = 0,33$; $p=0,71$; Fig.

15A), a duração da ingestão ($F_{2,20} = 0,68$; $p=0,51$; Fig. 15B), latência ($F_{2,20} = 0,29$; $p=0,75$; Fig. 15C) e frequência da ingestão ($F_{2,20} = 0,01$; $p=0,98$; Fig. 15D) permaneceram inalterados após o tratamento. A ingestão de água também não foi alterada com AM251 ($F_{2,20} = 1,04$; $p=0,36$), assim como os comportamentos não ingestivos, como autolimpeza ($F_{2,20} = 1,26$; $p=0,30$), exploração vertical ($F_{2,20} = 0,49$; $p=0,61$), locomoção ($F_{2,20} = 1,27$; $p=0,30$), imobilidade ($F_{2,20} = 0,38$; $p=0,68$) e SAP ($F_{2,20} = 0,69$; $p=0,51$), todos estes representados na Tabela 4. Apesar de não terem sido observadas respostas na ingestão alimentar, após as microinjeções com AM251, ANOVA de duas vias indicou uma resposta de aumento de ingestão no dia do experimento (variável “dia”) devido a privação alimentar de 24 horas tanto no controle quanto nos animais tratados com o antagonista ($F_{2,60} = 124,59$; $p < 0,05$), (Figura 16). A ANOVA de duas vias indicou que não houve interação entre as variáveis “dia X tratamento” nem com a variável “tratamento”. Todas as 23 microinjeções de AM251 atingiram a região rostral da *cnAcb* e estão representadas na figura esquemática (Figura 9).

A análise de variância ANOVA de uma via mostrou ainda que apesar dos grupos controle terem recebido diferentes concentrações de etanol, a ingestão alimentar não foi diferente entre os grupos, quando comparados em uma mesma análise ($F_{6,59} = 1,26$; $p=0,28$).

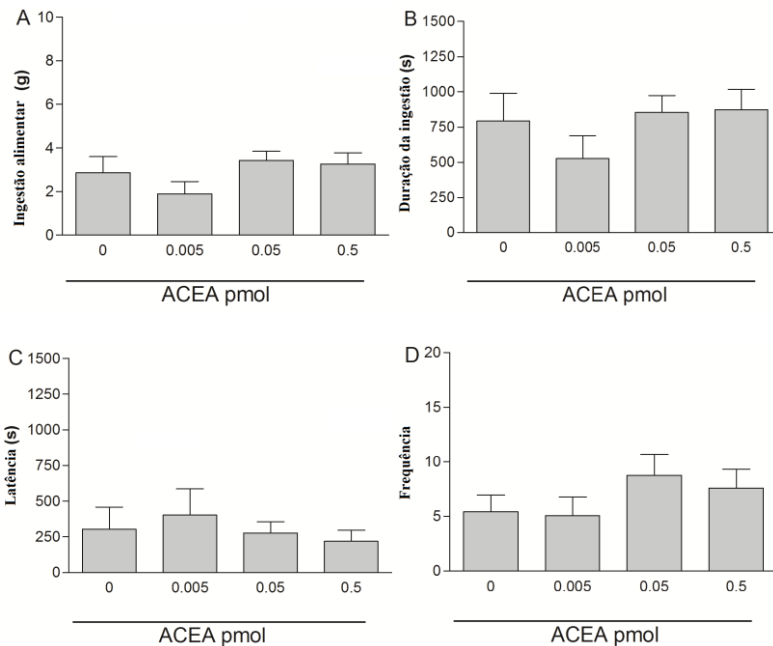


Figura 13. Representação dos comportamentos ingestivos na caixa de registro comportamental após a microinjeção de ACEA na concha do Núcleo Accumbens. A quantidade de alimento ingerido, em gramas, está representada no gráfico A, a duração da ingestão no gráfico B, latência para iniciar o comportamento ingestivo no gráfico C e frequência da ingestão no gráfico D. Ratos foram unilateralmente microinjetados com ambos veículo (Etanol 0,04% em Salina 0,9%, n=9) ou ACEA nas doses de 0,005 (n=12), 0,05 (n=12) e 0,5 pmol (n=10) na concha do núcleo accumbens e subsequentemente testados na caixa de ingestão por 30 minutos. As colunas representam média \pm E.P.M. (ANOVA de uma via seguida do teste de Newman-Keuls para múltiplas comparações).

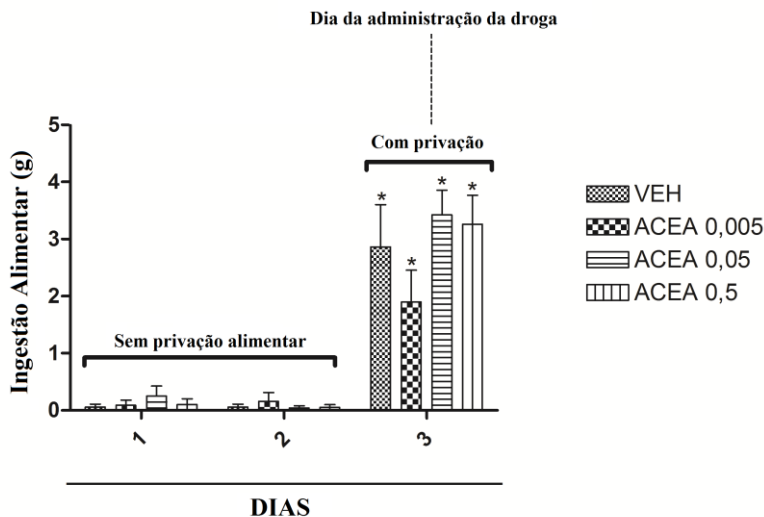


Figura 14. Representação do aumento da ingestão alimentar causado pela privação alimentar, no dia 3 (dia do experimento após 24h de privação alimentar) de ratos submetidos à microinjeção de ACEA. Os ratos foram ambientados na caixa de ingestão nos dois dias que antecediam o experimento (dia 1 e 2), sem privação alimentar e foram privados de alimento após a segunda ambientação. No dia 3 receberam as microinjeções e foram novamente submetidos à caixa de registro comportamental (caixa de ingestão). Ratos foram unilateralmente microinjetados no dia 3 (representado pela linha pontilhada), com ambos veículo (VEH- Etanol 0,04% em Salina 0,9%, n=9) ou ACEA nas doses de 0,005 (n=12), 0,05 (n=12) e 0,5 pmol (n=10) na concha do núcleo accumbens e subsequentemente testados na caixa de ingestão por 30 minutos. As colunas representam média \pm E.P.M. * $p < 0,05$ comparado aos dias 1 e 2 (ANOVA de duas vias seguida do teste de Newman-Keuls para múltiplas comparações).

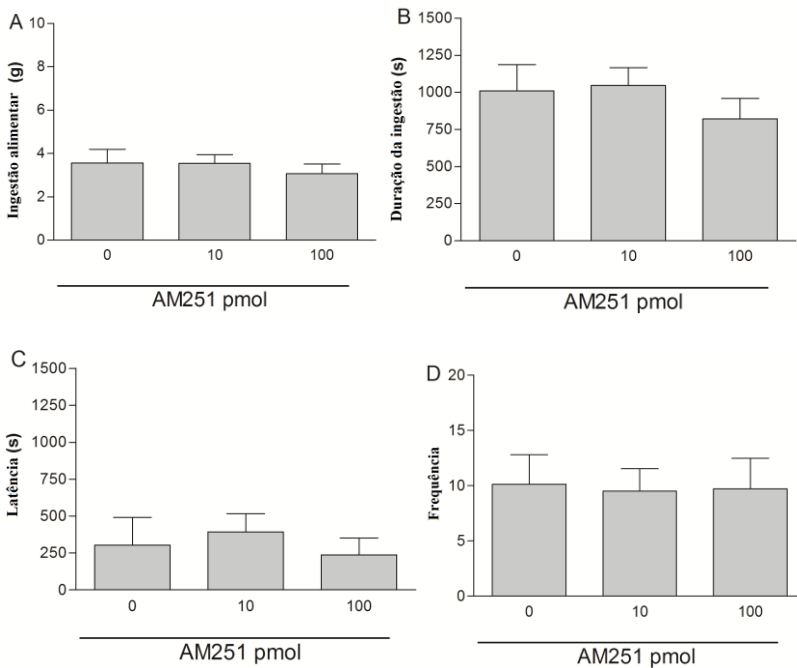


Figura 15. Representação dos comportamentos ingestivos na caixa de registro comportamental após a microinjeção de AM251 na concha do Núcleo Accumbens. A quantidade de alimento ingerido, em gramas, está representada no gráfico A, a duração da ingestão no gráfico B, latência para iniciar o comportamento ingestivo no gráfico C e frequência da ingestão no gráfico D. Ratos foram unilateralmente microinjetados com ambos veículo (Etanol 2% em Salina 0,9%, $n=7$) ou AM251 nas doses de 10 ($n=6$) e 100pmol ($n=10$) na concha do núcleo accumbens e subsequentemente testados na caixa de ingestão por 30 minutos. As colunas representam média \pm E.P.M. (ANOVA de uma via seguida do teste de Newman-Keuls para múltiplas comparações).

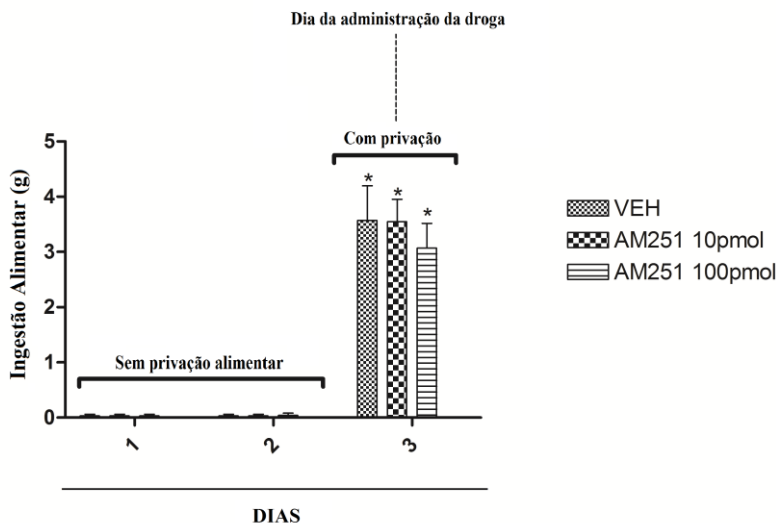


Figura 16. Aumento da ingestão alimentar causado pela privação alimentar, no dia 3 (dia do experimento após 24h de privação alimentar) de ratos submetidos à microinjeção de AM251. Os ratos foram ambientados na caixa de ingestão nos dois dias que antecediam o experimento (dia 1 e 2), sem privação alimentar, foram privados de alimento após a ambientação do dia 2 e no dia 3, após receberem as microinjeções, foram novamente submetidos à caixa de registro comportamental (caixa de ingestão). Ratos foram unilateralmente microinjetados no dia 3 (representado pela linha pontilhada), com ambos veículo (Etanol 2% em Salina 0,9%, n=7) ou AM251 nas doses de 10 (n=6) e 100pmol (n=10) na concha do núcleo accumbens e subsequentemente testados na caixa de ingestão por 30 minutos. As colunas representam média \pm E.P.M. * $p < 0,05$ comparado aos dias 1 e 2 (ANOVA de duas vias seguida do teste de Newman-Keuls para múltiplas comparações).

Tabela 3. Resultados da ANOVA de uma via mostrando os comportamentos dos ratos testados na caixa de registro comportamental após a microinjeção com veículo ou as doses de ACEA na região da concha do Núcleo Accumbens.

Variáveis	ACEA 0	ACEA 0,005	ACEA 0,05	ACEA 0,5	Efeitos da ANOVA
AL	5,5 ± 1,9	5,5 ± 1,1	8,0 ± 1,8	4,8 ± 0,9	$F_{3,39} = 0,89$; p=NS
EV	15,8 ± 1,9	17,0 ± 3,4	12,5 ± 2,3	14,8 ± 2,4	$F_{3,39} = 0,55$; p=NS
Locomoção (s)	56,6 ± 10,4	60,5 ± 8,5	53,9 ± 9,6	56,6 ± 8,8	$F_{3,39} = 0,09$; p=NS
Imobilidade (s)	324,3 ± 131,1	532,5 ± 137,1	282,6 ± 123,0	331,4 ± 154,2	$F_{3,39} = 0,73$; p=NS
SAP	1,6 ± 0,7	2,4 ± 0,4	2,9 ± 0,7	2,7 ± 0,9	$F_{3,39} = 0,51$; p=NS

Os dados foram expressos em média ± erro padrão da média. Ratos foram microinjetados unilateralmente com veículo (Etanol 0,04% em salina 0,9%) ou ACEA nas doses de 0,005, 0,05 ou 0,5 pmol (0,2µl) na concha do núcleo accumbens (cnAcb) e testados (30 min) na caixa de registro comportamental. AL, Autolimpeza EV, Exploração Vertical. SAP, Stretched-Attend Postures. NS indica não significante.

Tabela 4. Resultados da ANOVA de uma via mostrando os comportamentos dos ratos testados na caixa de registro comportamental após a microinjeção com veículo ou as doses de AM251 na região da concha do Núcleo Accumbens.

Variables	AM251 0	AM251 10	AM251 100	Main effects
AL	3,5 ± 0,9	6,1 ± 1,3	6,9 ± 1,7	$F_{3,39} = 0,89$; p=NS
EV	33,5 ± 15,2	20,1 ± 7,6	23,0 ± 5,2	$F_{3,39} = 0,55$; p=NS
Locomoção (s)	105,6 ± 28,1	53,7 ± 14,5	89,9 ± 18,8	$F_{3,39} = 0,87$; p=NS
Imobilidade (s)	183,3 ± 157,1	178,8 ± 87,3	314,8 ± 122,7	$F_{3,39} = 0,73$; p=NS
SAP	1,0 ± 0,4	1,3 ± 0,3	1,7 ± 0,4	$F_{3,39} = 0,51$; p=NS

Os dados foram expressos em média ± erro padrão da média. Ratos foram microinjetados unilateralmente com veículo (Etanol 2% em salina 0,9%) ou AM251 nas doses de 10 ou 100 pmol (0,2µl) na concha do núcleo accumbens (cnAcb) e testados (30 min) na caixa de registro comportamental. AL, Autolimpeza. EV, Exploração Vertical. SAP, Stretched-Attend Postures. NS indica não significante.

5. DISCUSSÃO

5.1 Ansiedade

O sistema canabinóide é um importante modulador de muitos outros sistemas de neurotransmissão como é demonstrado amplamente pela literatura (CARVALHO *et al.*, 2010; CHEER *et al.*, 2004; MANZONI e BOCKAERT, 2001). Uma ampla variedade de efeitos em muitas regiões cerebrais ocorrem quando esse sistema é farmacologicamente modulado (CAMPOS *et al.*, 2010; RIBEIRO *et al.*, 2009; MOREIRA *et al.*, 2007).

Efeitos ansiolíticos são os mais comumente observados nos comportamentos de ansiedade, quando há manipulação farmacológica do sistema canabinóide, sistêmica e centralmente, no Labirinto em Cruz Elevado (LCE) (BORTOLATO *et al.*, 2006; BRAIDA *et al.*, 2007; RUBINO *et al.*, 2007; MOREIRA *et al.*, 2007). Entretanto, efeitos ansiogênicos também têm sido descritos em modelos de estresse crônico. Por exemplo, um agonista CB1 sistemicamente administrado promoveu respostas ansiogênicas em ratos (HILL e GORZALKA, 2004). Além disso, o THC sistêmico, o componente psicoativo da *cannabis*, promoveu efeitos ansiogênicos em ratos testados no LCE (SCHRAMM-SAPYTA *et al.*, 2007), bem como o componente não-psychoativo da *cannabis*, o canabidiol, mostrou-se ansiogênico após administração sistêmica crônica (ELBATSH *et al.*, 2012) e aumentou a expressão de fos no nAcb (GUIMARÃES *et al.*, 2004). O efeito ansiogênico de agonistas canabinóides em ratos parece também envolver o sistema opióide, uma vez que a ansiogênese promovida por um agonista de receptores CB1, foi antagonizada por um antagonista de receptores opióides (MARÍN *et al.*, 2003).

Esta pesquisa focou na região rostral do nAcb e tem sua justificativa em estudos anteriores de nosso laboratório, nos quais foram obtidas respostas ansiolíticas/ansiogênicas através da modulação farmacológica de alguns sistemas neurotransmissores (GABAérgico, glutamatérgico e noradrenérgico) na cnAcb rostral. LOPES *et al.*, 2007 mostraram que os agonistas GABAérgicos na cnAcb induziu efeitos

ansiolíticos e DA CUNHA *et al.*, 2008a, 2008b mostraram um efeito ansiolítico após a administração de antagonistas de receptores AMPA na cnAcb em ratos testados no LCE. KOCHENBORGER *et al.*, 2012, mostrou um efeito ansiolítico do agonista adrenérgico $\alpha 2$ injetado na cnAcb rostral, em ratos submetidos ao LCE. No entanto, também há evidências de um papel das regiões mais caudais na cnAcb na modulação de comportamentos defensivos (REYNOLDS e BERRIDGE, 2001, 2002, 2003).

Este estudo utilizando um agonista CB1 sintético, ACEA, mostra um efeito ansiogênico induzido pela microinjeção de ACEA na região rostral da cnAcb, com uma redução significativa na porcentagem de tempo e número de entradas nos braços abertos do LCE. Estes parâmetros representam um índice espaço-temporal da ansiedade no modelo de LCE, onde os braços abertos são considerados áreas aversivas do aparato (RODGERS e JOHNSON, 1995). No entanto, outras variáveis etológicas que representam os estados emocionais, tais como SAP e imersão de cabeça, (RODGERS *et al.*, 1999) não foram alterados, apesar do efeito ansiogênico, sugerido pela diminuição de variáveis espaço-temporais, ter ocorrido.

O presente estudo também demonstrou que o efeito ansiogênico induzido pela microinjeção de ACEA nas regiões mais rostrais da cnAcb não é decorrente da dispersão da droga para o ventrículo lateral. A fim de excluir a possibilidade de que a droga se espalhasse para o ventrículo e assim explicando alguns dos efeitos, ACEA 0,05 pmol injetada no ventrículo lateral, e não mostrou ter qualquer efeito sobre comportamentos relacionados à ansiedade no LCE (Tabela 2). A especificidade regional do efeito é evidente quando a dose de 0,05 pmol foi eficaz em promover comportamentos relacionados à ansiedade somente quando a microinjeção ocorreu na cnAcb mostrando dessa forma que um possível extravasamento da droga não estaria interferindo nos resultados obtidos.

O nAcb recebe uma ampla variedade de aferências de regiões cerebrais e envia projeções para muitas outras, sendo modulada por vários sistemas neuroquímicos como GABAérgico, noradrenérgico e dopaminérgico (ver BASAR *et al.*, 2010), e sabe-se que os canabinóides podem modular a neurotransmissão GABAérgica (MANZONI e

BOCKAERT, 2001), dopaminérgica (CHEER *et al.*, 2004) e noradrenérgica (CARVALHO *et al.*, 2010) no nAcb. Sabe-se também que os receptores CB1 estão presentes no corpo estriado, incluindo o nAcb (TSOU *et al.*, 1998) e algumas manipulações farmacológicas com canabinóides podem ser capazes de alterar o humor e ansiedade (WITKIN *et al.*, 2005).

Dados presentes na literatura sugerem que a neurotransmissão dopaminérgica pode ser a base das respostas ansiogênicas aqui relatadas. A administração de $\Delta 9$ -tetra-hidrocanabinol (a qual mostrou ser ansiogênica em ratos testados no LCE, SCHRAMM-SAPYTA *et al.*, 2007) aumenta o efluxo de dopamina no córtex pré-frontal medial e no nAcb de ratos em um estudo de microdiálise (CHEN *et al.*, 1990, 1991.); $\Delta 9$ -tetrahidrocanabinol, heroína e um agonista canabinóide também aumentam a dopamina extracelular na cnAcb de ratos (TANDA *et al.*, 1997).

Sabe-se ainda que ansiolíticos clinicamente eficazes, tais como benzodiazepínicos, podem diminuir a concentração de dopamina no nAcb de ratos (FINLAY *et al.*, 1992). A clonidina, um agonista adrenérgico, induz efeito ansiolítico no LCE quando injetada na cnAcb de ratos (KOCHENBORGER *et al.*, 2012), e, quando co-administrada com midazolam, reduz o efluxo de dopamina no nAcb (MURAI *et al.*, 1998). No entanto FG 7142 (N-Metil-Beta-Carbolina-3-Carboxamida), um agonista inverso benzodiazepínico, aumentou a expressão de c-Fos no nAcb (SINK *et al.*, 2010).

Assim, uma vez que é observado um aumento da dopamina na cnAcb com a utilização de drogas ansiogênicas, como beta-CCE (Etil-Beta-Carbolina-3-Carboxilato) e FG 7142, (MCCULLOUGH e SALAMONE, 1992) e sob condições de estresse (KALIVAS e DUFFY, 1995), sugerimos que o efeito ansiogênico, induzido por 0,05 pmol de ACEA, pode ser devido a um aumento de dopamina no nAcb, porém são necessários mais estudos para melhor investigar essa possibilidade.

O papel da neurotransmissão GABAérgica também é bem estabelecido na modulação da ansiedade no Acb (LOPES *et al.*, 2007, 2012). O nosso laboratório demonstrou efeitos ansiolíticos dos agonistas GABAérgicos, quando administrado na cnAcb de ratos

testados no LCE (LOPES *et al.*, 2007) e os canabinóides pode inibir a transmissão GABAérgica (MANZONI e BOCKAERT, 2001).

Sugerimos que a ativação do receptor CB1 pode inibir a atividade GABAérgica e, assim, aumentar a atividade dopaminérgica, uma vez que se sabe que a estimulação dos receptores CB1 em terminais nervosos GABAérgicos aumenta a liberação de dopamina no nAcb de ratos (SPERLÁGH *et al.*, 2009), que foi sugerido anteriormente que causa aumento da ansiedade. Assim, é necessário investigar em estudos futuros, se o efeito ansiogênico induzido pela microinjeção de 0,05 pmol de ACEA na cnAcb rostral observado no presente estudo é devido a uma inibição de neurotransmissão GABAérgica no núcleo.

A literatura mostra que os efeitos dos agonistas canabinóides são geralmente duais, em que as doses mais elevadas são geralmente ansiogênicas e doses mais baixas são ansiolíticas (VIVEROS *et al.*, 2005; HALLER *et al.*, 2004; PATEL e HILLARD, 2006; GENN *et al.*, 2004). O efeito ansiogênico é também observado quando agonistas inversos canabinóides são injetados na amígdala basolateral ou intraperitonealmente (TAMBARO *et al.*, 2013; SINK *et al.*, 2010; DONO e CURRIE, 2012).

Caracteristicamente, drogas que promovem um efeito ansiolítico através da modulação dos receptores canabinóides, apresentam uma curva de dose-resposta em “U” invertido (MOREIRA *et al.*, 2007; PATEL e HILLARD 2006; RIBEIRO *et al.*, 2009), o que é contrário ao nosso estudo, no qual obteve-se um efeito ansiogênico com um agonista, demonstrado por uma curva dose-resposta em forma de “U”. MOREIRA *et al.*, 2007 obteve efeitos de tipo ansiolítico quando a mesma dose eficaz de agonista utilizado no nosso estudo foi microinjetada na substância cinzenta periaquedutal, enquanto nenhum efeito foi observado após a administração de 0,5 pmol ACEA na mesma área.

Nós sugerimos que a ausência de resultados na menor dose utilizada pode ser devido a uma modesta ativação dos receptores, sendo incapaz de evocar resposta mensurável e a dose maior, de 0,5 pmol pode ser que estivesse causando uma superestimulação dos receptores

promovendo assim uma dessensibilização e ausência de efeito, porém mais estudos são necessários para confirmar esta hipótese.

Estes dados indicam que a neurotransmissão canabinóide pode modular diferencialmente o comportamento relacionado com ansiedade de acordo com a região específica do cérebro. Além disso, estudos futuros utilizando outras drogas que modulam o sistema endocanabinóide, tal como outros agonistas do receptor CB1, inibidores da hidrólise endocanabinoide, bem como antagonistas seletivos dos receptores CB1 deve reforçar o presente estudo, que aponta para um papel ansiogênico dos receptores CB1 na *cnAcb*.

5.2 Ingestão Alimentar

A ativação de receptores CB1 com administração sistêmica e na *cnAcb*, promove respostas hiperfágicas e aumenta a quantidade de alimento ingerido em ratos saciados e pré-saciados com alimento contendo alto valor hedônico e carboidratos (DESHMUKH e SHARMA, 2012; CORTÉS-SALAZAR *et al.*, 2012; ESCARTÍN-PEREZ *et al.*, 2009); ACEA quando injetado na *cnAcb*, aumenta a ingestão com alto valor hedônico em ratos pré-saciados (CORTÉS-SALAZAR *et al.*, 2012) e os agonistas CB1 WIN 55, 212-2 e CP 55,940, aumentam a ingestão em ratos saciados com ração padrão (CORTÉS-SALAZAR *et al.*, 2014).

A manipulação farmacológica dos receptores CB1 demonstra importantes efeitos sobre comportamentos ingestivos (KOCH e MATTHEWS, 2001; COTA, 2006; WILLIAMS e KIRKHAM, 1999; WILLIAMS *et al.*, 1998; HO *et al.*, 2007; VERTY *et al.*, 2005; DESHMUKH e SHARMA, 2012; CORTÉS-SALAZAR *et al.*, 2012; ESCARTÍN-PEREZ *et al.*, 2009). Apesar dos agonistas CB1 serem bem estabelecidos na literatura como drogas que alteram a ingestão alimentar, não obtivemos efeitos sobre comportamentos ingestivos em ratos privados após a microinjeção de ACEA na *cnAcb* (figura 13).

GÓMEZ *et al.*, 2002, assim como demonstramos em nossos resultados, também não observaram alterações na ingestão alimentar com a administração central de agonistas canabinóides (i.c.v.) em ratos parcialmente saciados (24 horas de privação de alimento, alimentados por 60 minutos antes do teste) e com administração sistêmica em ratos privados (descrito por WILLIAMS *et al.*, 1998).

Estes dados previamente relatados, assim como outros, mostram que o estado nutricional, o valor hedônico dos alimentos, as doses utilizadas nesses trabalhos e a localização das microinjeções são muito importantes nas respostas ingestivas, relacionadas aos receptores canabinóides (GÓMEZ *et al.*, 2002; DESHMUKH e SHARMA, 2012; CORTÉS-SALAZAR *et al.*, 2012; BERMUDEZ-SILVA *et al.*, 2010; MCLAUGHLIN *et al.*, 2005; WERNER e KOCH, 2003; CHAMBERS *et al.*, 2004; ESCARTÍN-PÉREZ *et al.*, 2009).

Outro fato relevante é que, a região rostral da *cnAcb*, modula comportamentos ingestivos através de múltiplos sistemas neuroquímicos (LOPES *et al.*, 2007, 2012; REYNOLDS e BERRIDGE, 2001, 2002, 2003), mas em nosso presente estudo, as manipulações farmacológicas de receptores CB1 rostralmente localizados na *cnAcb*, não induziram alterações na ingestão alimentar em ratos.

Em nosso estudo prévio, em que avaliamos comportamentos defensivos, respostas relacionadas a esses comportamentos foram obtidas quando o agonista ACEA foi administrado rostralmente na *cnAcb*. Talvez os canabinóides no *accumbens* exibam uma diferença rostrocaudal na modulação de comportamentos ingestivos e defensivos, como observado em outros estudos. REYNOLDS e BERRIDGE (2001, 2002 e 2003) observaram que existem diferenças entre comportamentos ingestivos e defensivos com relação à modulação GABAérgica e glutamatérgica rostrocaudal de tal forma que as regiões rostrais foram responsáveis pela modulação de comportamentos ingestivos, enquanto as regiões caudais pela modulação de comportamentos defensivos.

Essa diferença de respostas na região rostral da *cnAcb*, em relação ao nosso estudo prévio (KOCHENBORGER *et al.*, 2012), no qual um agonista adrenérgico promoveu apenas respostas relacionadas a comportamentos defensivos e não ingestivos, nos mostram que,

dependendo da neurotransmissão e dos receptores ao longo da distribuição rostrocaudal na *cnAcb*, estes sejam responsáveis diferentemente por uma ampla gama de respostas. Nós acreditamos que isso pode estar acontecendo também com os canabinóides, uma vez que a manipulação farmacológica dos receptores na região rostral parece modular apenas comportamentos relacionados à ansiedade (KOCHENBORGER *et al.*, 2014).

O presente estudo mostrou que a privação alimentar promove considerável aumento da ingestão alimentar, uma vez que os animais que receberam veículo estavam fortemente motivados ao comportamento ingestivo e ACEA quando injetada na *cnAcb* rostral não foi hábil em promover qualquer efeito na ingestão de alimentos nesses animais privados de alimentação. A princípio, esse resultado sugere que a ativação dos receptores CB1 na região rostral da concha, falhou em aumentar a sinalização canabinóide que talvez pudesse estar previamente elevada devido a privação alimentar e, desse modo, o agonista não foi capaz de se sobrepor à resposta ingestiva elevada pelo jejum, mostrando que esse sistema parece estar pouco envolvido na ingestão quando sinais periféricos e centrais já estão ativados para estimular o animal a comer.

Para melhor entender a circuitaria canabinóide e em vista do nosso protocolo com privação e estado de jejum, sabendo que há liberação de canabinóides endógenos no *Accumbens* em condições de privação alimentar (KIRKHAM *et al.*, 2002), nós investigamos se o bloqueio dos receptores com o antagonista AM251 seria hábil em promover hipofagia após a microinjeção, uma vez que o antagonismo de receptores CB1 leva a redução da ingestão alimentar em ratos privados de alimento, restritos e pré-saciados (GÓMEZ *et al.*, 2002; MERROUN *et al.*, 2009; MCLAUGHLIN *et al.*, 2005; WERNER e KOCH, 2003; SORIA-GÓMEZ *et al.*, 2014).

Apesar do antagonismo dos receptores CB1 ser bem estabelecido na atenuação da ingestão alimentar em ratos privados, restritos e parcialmente saciados (WERNER e KOCH, 2003; MCLAUGHLIN *et al.*, 2005; CHAMBERS *et al.*, 2004), nós não observamos redução na ingestão alimentar após 30 minutos de observação, com a administração do antagonista AM251 na *cnAcb*.

A administração i.c.v. de outro antagonista CB1 SR141716A, não afeta a ingestão alimentar em ratos privados de alimento por 24 horas (GÓMEZ *et al.*, 2002), e não promove efeitos na ingestão alimentar quando administrado sistemicamente em animais saciados (DESHMUKH e SHARMA, 2012). no nAcb de ratos saciados após 1 e 4 horas de observação (SORIA-GÓMEZ *et al.*, 2007) e em animais privados de alimento por 12 horas, a administração i.c.v. do antagonista AM281, diminuiu a ingestão alimentar induzida por privação, 30 minutos à 6 horas após as microinjeções, mas apenas nas doses mais altas administradas (WERNER e KOCH, 2003).

No Acb, com 24 horas de privação alimentar, a microinjeção de AM251 promove efeitos hipofágicos após 1 e 4 horas de ingestão (SORIA-GÓMEZ *et al.*, 2014). É importante notar que os procedimentos experimentais foram conduzidos de forma diferente dos nossos, uma vez que os experimentos de SORIA-GÓMEZ *et al.*, 2014 foram feitos com ciclo invertido (luzes desligando às 8 am), as doses utilizadas foram mais altas do que as nossas doses e o período de observação da ingestão alimentar, após as microinjeções, foram maiores que o nosso (1-4 horas) onde nós observamos por 30 minutos após as microinjeções, seguindo o protocolo que nosso grupo de pesquisa vem trabalhando nos últimos anos. Apesar dos canabinóides modularem a ingestão alimentar sobre condições de privação, nós podemos inferir que o receptor CB1 na cnAcb não modula comportamentos ingestivos sobre privação alimentar em 30 minutos de observação, e que sua modulação parece ser mesmo a longo prazo.

Esses resultados obtidos com agonista e antagonista do receptor CB1, sugerem que os efeitos da microinjeção canabinóide na cnAcb rostral, na ingestão alimentar talvez requer doses maiores do antagonista e parece acontecer apenas a longo prazo, requerendo um tempo maior para apresentar algum efeito. Desse modo, nosso trabalho abre novas perspectivas para estudos futuros que visem melhor compreender através de outras ferramentas metodológicas e farmacológicas, ampliando o conhecimento e melhor esclarecendo o papel da concha do Acb na modulação canabinóide da ingestão alimentar em condições de privação.

6. CONCLUSÕES

A ativação de receptores CB1 na região rostral da *cnAcb* pode modular o nível de medo/ansiedade em ratos, sendo ansiogênica em animais testados no LCE.

A ativação e bloqueio dos receptores CB1 na região rostral da concha do Núcleo Accumbens, não altera a ingestão alimentar em ratos privados, 30 minutos após a microinjeção de agonista e antagonista canabinóide, respectivamente.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMCZYK, P.; GOLDA, A.; MCCREARY, A.C.; FILIP, M.; PRZEGALINSKI, E. Activation of endocannabinoid transmission induces antidepressant-like effects in rats. *Journal of Physiology and Pharmacology*. **59**: 217-228, 2008.

ANDRÉ, A. e GONTHIER, M.P. The endocannabinoid system: its roles in energy balance and potential as a target for obesity treatment. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. **42**: 1788-1801, 2010.

AMERI, A. The effects of cannabinoids on the brain. *Progress in Neurobiology*. **58**: 315-48, 1999.

BAGOT, R.C.; PARISE, E.M.; PEÑA, C.J.; ZHANG, H.X.; MAZE, I.; CHAUDHURY, D.; PERSAUD, B.; CACHEPE, R.; BOLAÑOS-GUZMÁN C.A.; CHEER, J.F.; DEISSEROTH, K.; HAN, M.H.; NESTLER, E.J. Ventral hippocampal afferents to the nucleus accumbens regulate susceptibility to depression. *Nature Communications*. **6**: 7062, 2015.

BASAR, K.; SESIA, T.; GROENEWEGEN, H.; STEINBUSCH, H. W. M.; VISSER-VANDEWALLE, V.; TEMEL, Y. Nucleus accumbens and impulsivity. *Progress in Neurobiology*. **92**: 533-557, 2010.

BASSO, A. M. e KELLEY, A. E. Feeding Induced by GABAA Receptor Stimulation Within the Nucleus Accumbens Shell: Regional Mapping and Characterization of Macronutrient and Taste Preference. *Behavioral Neuroscience*. **113**: 324-336, 1999.

BERMUDEZ-SILVA, F. J.; VIVEROS, M. P.; MCPARTLAND, J. M.; RODRIGUEZ DE FONSECA, F. The endocannabinoid system, eating behavior and energy homeostasis: the end or a new beginning? *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*. **95**: 375-382, 2010.

BORTOLATO, M.; CAMPOLONGO, P.; MANGIERI, R.A.; SCATTONI, M.L.; FRAU, R.; TREZZA, V.; LA RANA, G.; RUSSO, R.; CALIGNANO, A.; GESSA, G.L.; CUOMO, V.; PIOMELLI, D. Anxiolytic-like properties of the anandamide transport inhibitor AM404. *Neuropsychopharmacology* **31**: 2652-2659, 2006.

BRAIDA, D.; LIMONTA, V.; MALABARBA, L.; ZANI, A.; SALA, M. 5-HT_{1A} receptors are involved in the anxiolytic effect of delta9-tetrahydrocannabinol and AM 404, the anandamide transport inhibitor, in Sprague–Dawley rats. *European Journal of Pharmacology*. **555**: 156-163, 2007.

BUSQUETS-GARCIA, A.; PUIGHERMANAL, E.; PASTOR, A.; DE LA TORRE, R.; MALDONADO, R.; OZAITA, A. Differential Role of Anandamide and 2-Arachidonoylglycerol in Memory and Anxiety-like Responses. *Biological Psychiatry*. **70**: 479-486, 2011.

CAMPOS, A. C.; FERREIRA, F. R.; GUIMARÃES, F. S.; LEMOS, J. I. Facilitation of endocannabinoid effects in the ventral hippocampus modulates anxiety-like behaviors depending on previous stress experience. *Neuroscience*. **167**: 238-246, 2010.

CAROBREZ, A. P. e BERTOGLIO, L. J. Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior: The elevated plus-maze model 20 years on. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. **29**: 1193-1205, 2005.

CARVALHO, A. F.; MACKIE, K.; VAN BOCKSTAELE, E.J. Cannabinoid modulation of limbic forebrain noradrenergic circuitry. *European Journal of Neuroscience*. **31**(2): 286-301, 2010.

CHAMBERS, A. P.; SHARKEY, K. A.; KOOPMANS, H. S. Cannabinoid (CB)1 receptor antagonist, AM 251, causes a sustained reduction of daily food intake in the rat. *Physiology & Behavior*. **82**: 863-869, 2004.

CHEER, J. F.; WASSUM, K. M.; HEIEN, M. L. A. V.; PHILLIPS, P. E. M.; WIGHTMAN, R. M. Cannabinoids Enhance Subsecond Dopamine Release in the Nucleus Accumbens of Awake Rats. *The Journal of Neuroscience*. **24**(18):4393–4400, 2004.

CHEN, J.; PAREDES, W.; LOWINSON, J. H.; GARDNER, E. L. Δ^9 -Tetrahydrocannabinol enhances presynaptic dopamine efflux in medial prefrontal cortex. *European Journal of Pharmacology*. **190**: 259-262, 1990.

CHEN, J.; PAREDES, W.; LOWINSON, J. H.; GARDNER, E. L. Strain-specific facilitation of dopamine efflux by Δ^9 -tetrahydrocannabinol in the nucleus accumbens of rat: An in vivo microdialysis study. *Neuroscience Letters*. **129**: 136-140, 1991.

COTA, D.; MARSICANO, G.; TSCHÖP, M.; GRÜBLER, Y.; FLACHSKAMM, C.; SCHUBERT, M., et al. The endogenous cannabinoid system affects energy balance via central orexigenic drive and peripheral lipogenesis. *Journal of Clinical Investigation*. **112**: 423–431, 2003.

COTA, D.; TSCHÖP, M. H.; HORVATH, T. L.; LEVINE, A. S. Cannabinoids, opioids and eating behavior: The molecular face of hedonism? *Brain Research Reviews*. **51**: 85-107, 2006.

CORTÉS-SALAZAR, F.; MANCILLA-DÍAZ, J. M.; LÓPEZ-ALONZO, V. E.; GONZÁLEZ-HERNÁNDEZ, B.; ESCARTÍN-PÉREZ, R. E. Relationship between CB1 receptors in the Nucleus Accumbens Shell and the hedonic value of food. *International Journal of Hispanic Psychology*. **5**: 29-38, 2012.

CORTÉS-SALAZAR, F.; SUÁREZ ORTÍZ, J. O.; CANDEJAS TREJO, N. M.; MANCILLA-DÍAZ, J. M.; LÓPEZ-ALONZO, V. E.; ESCARTÍN-PÉREZ, R. E. Effects of CB1 cannabinoid receptor activation in the Nucleus Accumbens Shell on feeding behavior. *Acta Colombiana de Psicología*. **17**(2): 61-68, 2014.

CRUZ, A. P. M.; FREI, F.; GRAEFF, F. G. Ethopharmacological analysis of rat behavior on the elevated plus-maze. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. **49**: 171-176, 1994.

DA CUNHA, I. C.; DE NAZARETH, A. M.; VARGAS, J. C.; FERRAZ, A.; NETO, J. M.; PASCHOALINI, M. A.; FARIA, M. S. The microinjection of AMPA receptor antagonist into the accumbens shell failed to change food intake, but reduced fear-motivated behaviour in free-feeding female rats. *Behavioural Brain Research*. **193**: 243-247, 2008a.

DA CUNHA, I. C.; LOPES, A. P. F.; STEFFENS, S. M.; FERRAZ, A.; VARGAS, J. C.; DE LIMA, T. C. M.; MARINO NETO, J.; PASCHOALINI, M. A.; FARIA, M. S. The microinjection of AMPA receptor antagonist into the accumbens shell, but not into the accumbens core, induces anxiolysis in an animal model of anxiety. *Behavioural Brain Research*. **188**: 91-99, 2008b.

DELFS, J. M.; ZHU, Y.; DRUHAN, J. P.; ASTON-JONES, G. S. Origin of noradrenergic afferents to the shell subregion of the nucleus

accumbens: Anterograde and retrograde tract-tracing studies in the rat. *Brain Research*. **806**: 127–140, 1998.

DESHMUKH, R. R., SHARMA, P. L. Stimulation of accumbens shell cannabinoid CB1 receptors by noladin ether, a putative endocannabinoid, modulates food intake and dietary selections in rats. *Pharmacological Research*. **66**: 276-82, 2012.

DEVANE, W. A.; HANUS, L.; BREUER, A.; PERTWEE, R. G.; STEVENSON, L. A.; GRIFFIN, G. et al. Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science*. **258**: 1946–1949, 1992.

DI MARZO, V. The endocannabinoid system: Its general strategy of action, tools for its pharmacological manipulation and potential therapeutic exploitation. *Pharmacological Research*. **60**: 77-84, 2009.

DI MARZO, V.; LIGRESTI, A.; CRISTINO, L. The endocannabinoid system as a link between homoeostatic and hedonic pathways involved in energy balance regulationThe endocannabinoid system and food intake. *International Journal of Obesity. (Lond)*. **33**: S18-24, 2009.

DI MARZO, V.; GOPARAJU, S. K.; WANG, L.; LIU, J.; BÁTKAI, S.; JÁRAI, Z.; FEZZA, F.; MIURA, G. I.; PALMITER, R. D.; SUGIURA, T.; KUNOS, G. Leptin-regulated endocannabinoids are involved in maintaining food intake. *Nature*. **410**(6830): 822-825, 2001.

DONO, L. M. e CURRIE, P. J. The cannabinoid receptor CB1 inverse agonist AM251 potentiates the anxiogenic activity of urocortin I in the basolateral amygdala. *Neuropharmacology*. **62**: 192-199, 2012.

ELBATSH, M.; ASSAREH, N.; MARSDEN, C.A.; KENDALL, D.A. Anxiogenic-like effects of chronic cannabidiol administration in rats. *Psychopharmacology*. **221**(2): 239-247, 2012.

ESCARTÍN-PÉREZ, R. E.; CENDEJAS-TREJO, N. M.; CRUZ-MARTÍNEZ, A. M.; GONZÁLEZ-HERNÁNDEZ, B.; MANCILLA-DÍAZ, J. M.; FLORÁN-GARDUÑO, B. Role of cannabinoid cb1 receptors on macronutrient selection and satiety in rats. *Physiology & Behavior*. **96**: 646–650, 2009.

FINLAY, J. M.; DAMSMA, G.; FIBIGER, H. C. Benzodiazepine-induced decreases in extracellular concentrations of dopamine in the nucleus accumbens after acute and repeated administration. *Psychopharmacology*. **106**(2): 202-208, 1992.

GENN, R. F.; TUCCI, S.; MARCO, E. M.; VIVEROS, M. P.; FILE, S. E. Unconditioned and conditioned anxiogenic effects of the cannabinoid receptor agonist CP 55,940 in the social interaction test. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. **77**: 567-573, 2004.

GÓMEZ, R.; NAVARRO, M.; FERRER B.; TRIGO, J. M.; BILBAO, A.; DEL ARCO, I.; CIPPITELLI, A.; NAVA, F.; PIOMELLI, D.; RODRÍGUEZ DE FONSECA, F. A peripheral mechanism for CB1 cannabinoid receptor-dependent modulation of feeding. *Journal of Neuroscience*. **22**(21): 9612-9617, 2002.

GRIEBEL, G.; STEMMELIN, J.; SCATTON, B. Effects of the cannabinoid CB1 receptor antagonist rimonabant in models of emotional reactivity in rodents. *Biological Psychiatry*. **57**: 261-267, 2005.

GUIMARÃES, V. M. C.; ZUARDI, A. W.; DEL BEL, E. A.; GUIMARÃES, F. S. Cannabidiol increases Fos expression in the

nucleus accumbens but not in the dorsal striatum. *Life Sciences*. **75**: 633–638, 2004.

HALFORD, J. C. G.; WANNINAYAKE, S. C. D.; BLUNDELL, J. E. Behavioral Satiety Sequence (BSS) for the Diagnosis of Drug Action on Food Intake. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. **61**: 159-168, 1998.

HALLER, J.; VARGA, B.; LEDENT, C.; FREUND, T. F. CB1 cannabinoid receptors mediate anxiolytic effects: convergent genetic and pharmacological evidence with CB1- specific agents. *Behavioural Pharmacology*. **15**: 299-304, 2004.

HARROLD, J. A.; ELLIOTT, J. C.; KING, P. J.; WIDDOWSON, P. S.; WILLIAMS, G. Down-regulation of cannabinoid-1 (CB-1) receptors in specific extrahypothalamic regions of rats with dietary obesity: a role for endogenous cannabinoids in driving appetite for palatable food? *Brain Research*. **952**: 232-238, 2002.

HEIDBREDER, C. A. e GROENEWEGEN, H. J. The medial prefrontal cortex in the rat: evidence for dorso-ventral distinction based upon functional and anatomical characteristics. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. **27**: 555-579, 2003.

HEIMER, L.; ZAHM, D. S.; CHURCHILL, L.; KALIVAS, P. W.; WOHLTMANN, C. Specificity in the projection patterns of accumbal core and shell in the rat. *Neuroscience*. **41**: 89-125, 1991.

HERKENHAM, M.; LYNN, A. B.; LITTLE, M. D.; JONSON, M. R.; MELVIN, L. S.; DE COSTA, B. R.; RICE, K. C. Cannabinoid receptor localization in brain. *Proceedings of National Academy of Sciences. USA* **87**: 1932-1936, 1990.

HILL, M. N. e GORZALKA, B. B. Enhancement of anxiety-like responsiveness to the cannabinoid CB1 receptor agonist HU-210 following chronic stress. *European Journal of Pharmacology*. **499**(3): 291-295, 2004.

HILL, M. N. e GORZALKA, B. B. Impairments in endocannabinoid signaling and depressive illness. *JAMA* **301**:1165-1166, 2009.

HO, J.; COX, J. M.; WAGNER, E. J. Cannabinoid-induced hyperphagia: correlation with inhibition of proopiomelanocortin neurons? *Physiology & Behavior*. **92**: 507-519, 2007.

JAMSHIDI, N. e TAYLOR, D. A. Anandamide administration into the ventromedial hypothalamus stimulates appetite in rats. *British Journal of Pharmacology*. **134**: 1151-1154, 2001.

KALIVAS, P. W. e DUFFY, P. Selective activation of dopamine transmission in the shell of the nucleus accumbens by stress. *Brain Research*. **675**: 325-328, 1995.

KELLEY, A. E. e SWANSON, C. J. Feeding induced by blockade of AMPA and kainate receptors within the ventral striatum: a microinfusion mapping study. *Behavioural Brain Research*. **89**: 107-113, 1997.

KELLEY, A. E.; BALDO, B. A.; PRATT, W. E.; WILL, M. J. Corticostriatal-hypothalamic circuitry and food motivation: Integration of energy, action and reward. *Physiology & Behavior*. **86**: 773-795, 2005.

KIRKHAM, T. C.; WILLIAMS, C. M.; FEZZA, F.; DI MARZO, V. Endocannabinoid levels in rat limbic forebrain and hypothalamus in relation to fasting, feeding and satiation: stimulation of eating by 2-

arachidonoyl glycerol. *British Journal of Pharmacology*. **136**: 550-557, 2002.

KOCH, J. E. e MATTHEWS, S. M. Delta9-tetrahydrocannabinol stimulates palatable food intake in Lewis rats: effects of peripheral and central administration. *Nutritional Neuroscience*. **4**: 179-187, 2001.

KOCHENBORGER, L.; ZANATTA, D.; BERRETTA, L. M.; LOPES, A. P. F.; WUNDERLICH, B. L.; JANUÁRIO, A. C.; MARINO NETO, J.; TERENCE, M. G.; PASCHOALINI, M. A.; FARIA, M. S. Modulation of fear/anxiety responses, but not food intake, following α -adrenoceptor agonist microinjections in the nucleus accumbens shell of free-feeding rats. *Neuropharmacology*. **62**(1): 427-435, 2012.

KOCHENBORGER, L.; LEVONE, B. R.; DA SILVA, E. S.; TASCHETTO, A. P. D.; TERENCE, M. G.; PASCHOALINI, M. A.; FARIA, M. S. The microinjection of a cannabinoid agonist into the accumbens shell induces anxiogenesis in the elevated plus-maze. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. **124**: 160-166, 2014.

LISBOA, S. F.; RESSEL, L. B.; ÁGUA, D. C.; GUIMARÃES, F. S. Activation of cannabinoid CB1 receptors in the dorsolateral periaqueductal gray induces anxiolytic effects in rats submitted to the Vogel conflict test. *European Journal of Pharmacology*. **593**: 73-78, 2008.

LOPES, A. P. F.; DA CUNHA, I. C.; STEFFENS, S. M.; FERRAZ, A.; VARGAS, J. C.; DE LIMA, T. C. M.; NETO, J. M.; FARIA, M. S.; PASCHOALINI, M. A. GABA and GABAB agonist microinjections into medial accumbens shell increase feeding and induce anxiolysis in an animal model of anxiety. *Behavioural Brain Research*. **184**: 142-149, 2007.

LOPES, A. P. F.; GANZER, L. S.; BORGES, A. C.; KOCHENBORGER, L.; JANUÁRIO, A. C.; FARIA, M. S., MARINONETO, J.; PASCHOALINI, M. A. Effects of GABA ligands injected into the nucleus accumbens shell on fear/anxiety-like and feeding behaviours in food-deprived rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. **101**: 41-48, 2012.

MACDONALD, A. F.; BILLINGTON, C. J.; LEVINE, A. S. Alterations in food intake by opioid and dopamine signaling pathways between the ventral tegmental area and the shell of the nucleus accumbens. *Brain Research*. **1018**: 78-85, 2004.

MAHLER, S. V.; SMITH, K. S.; BERRIDGE, K. C. Endocannabinoid hedonic hotspot for sensory pleasure: anandamide in nucleus accumbens shell enhances 'liking' of a sweet reward. *Neuropsychopharmacology*. **32**: 2267-2278, 2007.

MANZONI, O. J. e BOCKAERT, J. Cannabinoids inhibit GABAergic synaptic transmission in mice nucleus Accumbens, *European Journal of Pharmacology*. **412**: R3-R5, 2001.

MARÍN, S.; MARCO, E.; BISCAIA, M.; FERNÁNDEZ, B.; RUBIO, M.; GUAZA, C.; SCHMIDHAMMER, H.; VIVEROS, M. P. Involvement of the k-opioid receptor in the anxiogenic-like effect of CP 55,940 in male rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. **74**(3): 649-656, 2003.

MATIAS, I.; BISOGNO, T.; DI MARZO, V. Endogenous cannabinoids in the brain and peripheral tissues: regulation of their levels and control of food intake. *International Journal of Obesity. (Lond)*. **30**: S7-S12, 2006.

MCCULLOUGH, L. D. e SALAMONE, J. D. Anxiogenic drugs beta-CCE and FG 7142 increase extracellular dopamine levels in nucleus accumbens. *Psychopharmacology*. **109**(3): 379-382, 1992.

MCLAUGHLIN, R.J. e GOBBI, G. Cannabinoids and emotionality: a neuroanatomical perspective. *Neuroscience*. **204**: 134-144, 2012.

MCLAUGHLIN, P.J.; WINSTON K. M.; LIMEBEER C. L.; PARKER L. A.; MAKRIYANNIS A.; SALAMONE J. D. The cannabinoid CB1 antagonist AM 251 produces food avoidance and behaviors associated with nausea but does not impair feeding efficiency in rats. *Psychopharmacology*. **180**: 286-293, 2005.

MECHOULAM, R., BRAUN, P., GAONI, Y. A stereospecific synthesis of (–)-delta 1- and (–)-delta 1(6)-tetrahydrocannabinols. *Journal of American Chemical Society*. **89**: 4552–4554, 1967.

MERROUN, I.; ERRAMI, M.; HODDAH, H.; URBANO, G.; PORRES, J. M.; ARANDA, P.; LLOPIS, J.; LÓPEZ-JURADO, M. Influence of intracerebroventricular or intraperitoneal administration of cannabinoid receptor agonist (WIN 55,212-2) and inverse agonist (AM 251) on the regulation of food intake and hypothalamic serotonin levels. *British Journal of Nutrition*. **101**: 1569-1578, 2009.

MICALE, V.; CRISTINO, L.; TAMBURELLA, A.; PETROSINO, S.; LEGGIO, G. M.; DRAGO, F.; DI MARZO, V. Anxiolytic effects in mice of a dual blocker of fatty acid amide hydrolase and transient receptor potential vanilloid type-1 channels. *Neuropsychopharmacology*. **34**: 593–606, 2009.

MOISE, A. M.; EISENSTEIN, S. A.; ASTARITA, G.; PIOMELLI, D.; HOHMANN, A. G. An endocannabinoid signaling system modulates anxiety-like behavior in male Syrian hamsters. *Psychopharmacology (Berl)*. **200**: 333–346, 2008.

MOREIRA, F. A.; AGUIAR, D. C.; GUIMARÃES, F. S. Anxiolytic-like effect of cannabinoids injected into the rat dorsolateral periaqueductal gray. *Neuropharmacology*. **52**: 958-965, 2007.

MOREIRA, F. A.; KAISER, N.; MONORY, K.; LUTZ, B. Reduced anxiety-like behaviour induced by genetic and pharmacological inhibition of the endocannabinoid-degrading enzyme fatty acid amide hydrolase (FAAH) is mediated by CB1 receptors. *Neuropharmacology*. **54**: 141-150, 2008.

MOREIRA, F. A. e WOTJAK, C. T. Cannabinoids and anxiety. *Current Topics in Behavioral Neurosciences*. **2**: 429-50, 2010.

MORGANE, P. J.; GALLER, J. R.; MOKLER, D. J. A review of systems and networks of the limbic forebrain/limbic midbrain. *Progress in Neurobiology*. **75**: 143–160, 2005.

MURAI, T.; YOSHIDA, Y.; KOIDE, S.; TAKADA, K.; MISAKI, T.; KOSHIKAWA, N.; COOLS, A. R. Clonidine Reduces Dopamine and Increases GABA in the Nucleus Accumbens: An In Vivo Microdialysis Study. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. **60**: 695-701, 1998.

NADERI, N.; HAGHPARAST, A.; SABER-TEHRANI, A.; REZAIL, N.; ALIZADEH, A.M.; KHANI, A.; MOTAMEDI, F. Interaction between cannabinoid compounds and diazepam on anxiety-like behaviour of mice. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. **89**: 64-75, 2008.

NAIDU, P. S.; VARVEL, S. A.; AHN, K.; CRAVATT, B. F.; MARTIN, B. R.; LICHTMAN, A.H. Evaluation of fatty acid amide hydrolase inhibition in murine models of emotionality. *Psychopharmacology (Berl)*. **192**: 61-70, 2007.

NAUTA, W. J.; SMITH, G. P.; FAULL, R. L.; DOMESICK, V. B. Efferent connections and nigral efferents of the nucleus accumbens septi in the rat. *Neuroscience*. **3**: 385–401, 1978.

NAVARRO, M.; HERNÁNDEZ, E.; MUÑOZ, R. M.; DEL ARCO, I.; VILLANÚA, M. A.; CARRERA, M. R.; RODRÍGUEZ DE FONSECA, F. Acute administration of the CB1 cannabinoid receptor antagonist SR 141716A induces anxiety-like responses in the rat. *Neuroreport*. **8**: 491-496, 1997.

NISSEN, S. E.; NICHOLLS, S.J.; WOLSKI, K.; RODÉS-CABAU, J.; CANNON, C. P.; DEANFIELD, J. E.; DESPRÉS, J. P.; KASTELEIN, J. J.; STEINHUBL, S. R.; KAPADIA, S.; YASIN, M.; RUZYLLO, W.; GAUDIN, C.; JOB, B.; HU, B.; BHATT, D. L.; LINCOFF, A. M.; TUZCU, E. M. Effect of rimonabant on progression of atherosclerosis in patients with abdominal obesity and coronary artery disease: the STRADIVARIUS randomized controlled trial. *JAMA*. **299**: 1547-1560, 2008.

OTTONI, E. B. EthoLog 2.2: a tool for the transcription and timing of behavior observation sessions. *Behavior Research Methods, Instruments, & Computers*. **32**: 446-449, 2000.

PAGOTTO, U.; VICENNATI, V.; PASQUALI, R. The endocannabinoid system and the treatment of obesity. *Annals of Medicine*. **37**: 270-275, 2005.

PAGOTTO, U.; MARSICANO, G.; COTA, D.; LUTZ, B.; PASQUALI, R. The Emerging Role of the Endocannabinoid System in Endocrine Regulation and Energy Balance. *Endocrine Reviews*. **27**(1): 73-100, 2006.

PATEL, S. e HILLARD, C.J. Pharmacological evaluation of cannabinoid receptor ligands in a mouse model of anxiety: further

evidence for an anxiolytic role for endogenous cannabinoid signaling. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. **318**: 304-311, 2006.

PAXINOS, G. e WATSON, C. The rat brain in stereotaxic coordinates. *Academic Press*. 2007.

PELLOW, S.; CHOPIN, P.; FILE, S. E.; BRILEY, M. Validation of open : closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *The Journal of Neuroscience Methods*. **14**: 149-167, 1985.

PEZZE, M.A. e FELDON, J. Mesolimbic dopaminergic pathways in fear conditioning. *Progress in Neurobiology*. **74**: 301-320, 2004.

PIOMELLI, D.; GIUFFRIDA, A.; CALIGNANO, A.; RODRÍGUEZ DE FONSECA, F. The endocannabinoid system as a target for therapeutic drugs. *Trends in Pharmacological Sciences*. **21**: 218-224, 2000.

PIOMELLI, D. The molecular logic of endocannabinoid signalling. *Nature Reviews Neuroscience*. **4**: 873–884, 2003.

QUARTA, C.; MAZZA, R.; OBICI, S.; PASQUALI, R.; PAGOTTO, U. Energy balance regulation by endocannabinoids at central and peripheral levels. *Trends in Molecular Medicine*. **17**(9): 518-26, 2011.

REYNOLDS, S. M. e BERRIDGE, K. C. Fear and feeding in the nucleus accumbens shell: rostrocaudal segregation of GABA-elicited defensive behavior versus eating behavior. *The Journal of Neuroscience*. **21**: 3261–70, 2001.

REYNOLDS, S. M. e BERRIDGE, K. C. Positive and negative motivation in nucleus accumbens shell: Bivalent rostrocaudal gradients

for GABA-elicited eating, taste “liking”/”disliking” reactions, place preference/avoidance, and fear. *The Journal of Neuroscience*. **22**: 7308–7320, 2002.

REYNOLDS, S. M. e BERRIDGE, K. C. Glutamate motivational ensembles in nucleus accumbens: rostrocaudal shell gradients of fear and feeding. *European Journal of Neuroscience*. **17**: 2187-2200, 2003.

RIBEIRO, A.; FERRAZ-DE-PAULA, V.; PINHEIRO, M. L.; PALERMO-NETO, J. Dose-response effects of systemic anandamide administration in mice sequentially submitted to the open field and elevated plus-maze tests. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. **42**: 556-560, 2009.

RIEBE, C. J. e WOTJAK, C. T. Endocannabinoids and stress. *Stress*. **14**: 384-397, 2011.

RIEDEL, G.; FADDA, P.; MCKILLOP-SMITH, S.; PERTWEE, R. G.; PLATT, B.; ROBINSON, L. Synthetic and plant-derived cannabinoid receptor antagonists show hypophagic properties in fasted and non-fasted mice. *British Journal of Pharmacology*. **156**: 1154-1166, 2009.

RODGERS, R. J. e DALVI, A. Anxiety, defence and the elevated plus-maze. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. **21**: 801-810, 1997.

RODGERS, R. J.; CAO, B.-J.; DALVI, A.; HOLMES, A. Animal models of anxiety: an ethological perspective. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. **30**: 289-304, 1997.

RODGERS, R. J.; HALLER, J.; HOLMES, A.; HALASZ, J.; WALTON, T. J.; BRAIN, P. F. Corticosterone response to the plus-maze: High correlation with risk assessment in rats and mice. *Physiology & Behavior*. **68**: 47-53, 1999.

RODGERS, R. J. e JOHNSON, N. J. T. Factor analysis of spatiotemporal and ethological measures in the murine elevated plus-maze test of anxiety. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. **52**: 297-303, 1995.

ROOHBAKHSH, A.; KESHAVARZ, S.; HASANEIN, P.; REZVANI, M. E.; MOGHADDAM, A. H. Role of endocannabinoid system in the ventral hippocampus of rats in the modulation of anxiety-like behaviours. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*. **105**: 333-338, 2009.

ROOHBAKHSH, A.; MOGHADDAM, A. H.; MASSOUDI, R.; ZARRINDAST, M. R. Role of dorsal hippocampal cannabinoid receptors and nitric oxide in anxiety like behaviours in rats using the elevated plus-maze test. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*. **34**: 223-229, 2007.

RUBINO, T.; SALA, M.; VIGANÒ, D.; BRAIDA, D.; CASTIGLIONI, C.; LIMONTA, V.; GUIDALI, C.; REALINI, N.; PAROLARO, D. Cellular mechanisms underlying the anxiolytic effect of low doses of peripheral Delta9-tetrahydrocannabinol in rats. *Neuropsychopharmacology*. **32**: 2036-2045, 2007.

RUBINO, T.; GUIDALI, C.; VIGAN, D.; REALINI, N.; VALENTI, M.; MASSI, P.; PAROLARO, D. CB1 receptor stimulation in specific brain areas differently modulate anxiety-related behaviour. *Neuropharmacology*. **54**: 151-160, 2008.

RUEDA-OROZCO, P.E.; MONTES-RODRIGUEZ, C.J.; SORIA-GOMEZ, E.; MÉNDEZ-DÍAZ, M.; PROSPÉRO-GARCÍA, O. Impairment of endocannabinoids activity in the dorsolateral striatum delays extinction of behavior in a procedural memory task in rats. *Neuropharmacology*. **55**: 55-62, 2008.

RUTKOWSKA, M.; JAMONTT, J.; GLINIAK, H. Effects of cannabinoids on the anxiety-like response in mice. *Pharmacological Reports*. **58**: 200-206, 2006.

SAITO, V. M.; WOTJAK, C. T.; MOREIRA, F. A. Pharmacological exploitation of the endocannabinoid system: new perspectives for the treatment of depression and anxiety disorders? *Revista Brasileira de Psiquiatria*. **32**: Supl I, 2010.

SCHERMA, M.; MEDALIE, J.; FRATTA, W.; VADIVEL, S. K.; MAKRIYANNIS, A.; PIOMELLI, D.; MIKICS, E.; HALLE, R. J.; YASAR, S.; TANDA, G.; GOLDBERG, S. R. The endogenous cannabinoid anandamide has effects on motivation and anxiety that are revealed by fatty acid amide hydrolase (FAAH) inhibition. *Neuropharmacology*. **54**: 129-140, 2008.

SCHRAMM-SAPYTA, N.; CHA, Y.; CHAUDHRY, S.; WILSON, W.; SWARTZWELDER, H. S.; KUHN, C. Differential anxiogenic, aversive, and locomotor effects of THC in adolescent and adult rats. *Psychopharmacology*. **191**(4):867-877, 2007.

SEAMANS, J. K. e PHILLIPS, A. G. Selective memory impairments produced by transient lidocaine-induced lesions of the nucleus accumbens in rats. *Behavioral Neuroscience*. **108**: 456-468, 1994.

SETEM, J.; PINHEIRO, A. P.; MOTTA, V. A.; MORATO, S.; CRUZ, A. P. M. Ethopharmacological Analysis of 5-HT Ligands on the Rat Elevated Plus-Maze. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. **62**: 515-521, 1999.

SETLOW, B.; ROOZENDAAL, B.; MCGAUGH, J. L. Involvement of a basolateral amygdala complex-nucleus accumbens pathway in glucocorticoid-induced modulation of memory consolidation. *European Journal of Neuroscience*. **12**: 367-375, 2000.

SINK, K. S.; SEGOVIA, K. N.; SINK, J.; RANDALL, .P. A.; COLLINS, L. E.; CORREA, M.; MARKUS, E. J.; VEMURI, V. K.; MAKRIYANNIS, A.; SALAMONE, J. D. Potential anxiogenic effects of cannabinoid CB1 receptor antagonists/inverse agonists in rats: comparisons between AM4113, AM251, and the benzodiazepine inverse agonist FG-7142. *European Neuropsychopharmacology*. **20**: 112-122, 2010.

SORIA-GÓMEZ, E.; MATIAS, I.; RUEDA-OROZCO, P.E.; CISNEROS, M.; PETROSINO, S.; NAVARRO, L.; DI MARZO, V.; PROSPÉRO-GARCÍA, O. Pharmacological enhancement of the endocannabinoid system in the nucleus accumbens shell stimulates food intake and increases c-Fos expression in the hypothalamus. *British Journal of Pharmacology*. **151**: 1109-1116, 2007.

SORIA-GÓMEZ, E.; MÁRQUEZ-DIOSDADO, M. I.; MONTES-RODRÍGUEZ, C. J.; ESTRADA-GONZÁLEZ, V.; PROSPÉRO-GARCÍA, O. Oleamide administered into the nucleus accumbens shell regulates feeding behaviour via CB1 and 5-HT2C receptors. *International Journal of Neuropsychopharmacology*. **13**: 1247-1254, 2010.

SORIA-GÓMEZ, E.; MASSA, F.; BELLOCCHIO, L.; RUEDA-OROZCO, P.E.; CIOFI, P.; COTA, D.; OLIET, S.H.R.; PROSPÉRO-GARCÍA, O.; MARSICANO, G. Cannabinoid type-1 receptors in the paraventricular nucleus of the hypothalamus inhibit stimulated food intake. *Neuroscience*. **263**: 46-53, 2014.

SPERLÁGH, B. T.; WINDISCH, K.; ANDÓ, R. M. D.; SYLVESTER VIZI, E. Neurochemical evidence that stimulation of CB1 cannabinoid receptors on GABAergic nerve terminals activates the dopaminergic reward system by increasing dopamine release in the rat nucleus accumbens. *Neurochemistry International*. **54**(7):452-457, 2009.

STRATFORD, T. R. e KELLEY, A. E. GABA in the Nucleus Accumbens Shell Participates in the Central Regulation of Feeding Behavior. *The Journal of Neuroscience*. **17**: 4434-4440, 1997.

STRATFORD, T. R., SWANSON, C. J.; KELLEY, A. Specific changes in food intake elicited by blockade or activation of glutamate receptors in the nucleus accumbens shell. *Behavioural Brain Research*. **93**: 43-50, 1998.

STRATFORD, T. R. e KELLEY, A. E. Evidence of a Functional Relationship between the Nucleus Accumbens Shell and Lateral Hypothalamus Subserving the Control of Feeding Behavior. *The Journal of Neuroscience*. **19**: 11040-11048, 1999.

SUGIURA, T.; KONDO, S.; SUKAGAWA, A.; NAKANE, S.; SHINODA, A.; ITOH, K.; YAMASHITA, A.; WAKU, K. 2-Arachidonoylglycerol: a possible endogenous cannabinoid receptor ligand in brain. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **215**: 89-97, 1995.

SUGIURA, T., KISHIMOTO, S.; OKA, S.; GOKOH, M. Biochemistry, pharmacology and physiology of 2-arachidonoylglycerol, an endogenous cannabinoid receptor ligand. *Progress in Lipid Research*. **45**: 405-446, 2006.

TAMBARO, S.; TOMASI, M. L.; BORTOLATO, M. Long-term CB1 receptor blockade enhances vulnerability to anxiogenic-like effects of cannabinoids. *Neuropharmacology*. **70**: 268-277, 2013.

TANDA, G.; PONTIERI, F. E.; CHIARA, G. D. Cannabinoid and Heroin Activation of Mesolimbic Dopamine Transmission by a

Common μ 1 Opioid Receptor Mechanism. *Science*. **276**(5321):2048-2050, 1997.

THIEMANN, G.; WATT, C. A.; LEDENT, C.; MOLLEMAN, A.; HASENÖHRL, R. U. Modulation of anxiety by acute blockade and genetic deletion of the CB(1) cannabinoid receptor in mice together with biogenic amine changes in the forebrain. *Behavioral Brain Research*. **200**: 60-67, 2009.

TSOU, K.; BROWN, S.; SAÑUDO-PEÑA, M. C.; MACKIE, K.; WALKER, J. M. Immunohistochemical distribution of cannabinoid cb1 receptors in the rat central nervous system. *Neuroscience*. **83**: 393-411, 1998.

VERTY, A. N.; MCGREGOR, I. S.; MALLET, P. E., Paraventricular hypothalamic CB(1) cannabinoid receptors are involved in the feeding stimulatory effects of Delta(9)-tetrahydrocannabinol. *Neuropharmacology*. **49**: 1101–1109, 2005.

VIVEROS, M. P; MARCO, E. M.; FILE, S. E. Endocannabinoid system and stress and anxiety responses. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. **81**: 331-342, 2005.

WERNER, N. A.; KOCH, J. E. Effects of the cannabinoid antagonists AM281 and AM630 on deprivation-induced intake in Lewis rats. *Brain Research*. **967**: 290-292, 2003.

WILEY, J. L.; BURSTON, J. J.; LEGGETT, D. C.; ALEKSEEVA, O. O.; RAZDAN, R. K.; MAHADEVAN, A.; MARTIN, B. R. CB1 cannabinoid receptor-mediated modulation of food intake in mice. *British Journal of Pharmacology*. **145**: 293–300, 2005.

WILLIAMS, C. M. e KIRKHAM, T. C. Anandamide induces overeating: mediation by central cannabinoid (CB1) receptors. *Psychopharmacology (Berl)*. **143**: 315-317, 1999.

WILLIAMS, C. M.; ROGERS, P. J.; KIRKHAM, T. C. Hyperphagia in pre-fed rats following oral delta9-THC. *Physiology & Behavior*. **65**: 343-346, 1998.

WITKIN, J. M.; TZAVARA, E. T.; NOMIKOS, G. G. A role for cannabinoid CB1 receptors in mood and anxiety disorders. *Behavioural Pharmacology*. **16**: 315-331, 2005.

ZAHM, D.S. e BROG, J.S. On the significance of subterritories in the “Accumbens” part of the rat ventral striatum. *Neuroscience*. **50**: 751-767, 1992.

ZARRINDAST, M. R.; SARAHROODI, S.; ARZI, A.; KHODAYAR, M. J.; TAHERI-SHALMANI, S.; REZAYOF, A. Cannabinoid CB1 receptors of the rat central amygdala mediate anxiety-like behavior: interaction with the opioid system. *Behavioural Pharmacology*. **19**: 716-723, 2008.

ZNAMENSKY, V., ECHO, J. A., LAMONTE, N., CHRISTIAN, G., RAGNAUTH, A. e BODNAR, R. J. [gamma]-Aminobutyric acid receptor subtype antagonists differentially alter opioid-induced feeding in the shell region of the nucleus accumbens in rats. *Brain Research*. **906**: 84-91, 2001.

8. ANEXOS

Artigo publicado em 2014.

Título: The microinjection of a cannabinoid agonist into the accumbens shell induces anxiogenesis in the elevated plus-maze.

Revista: Pharmacology, Biochemistry and Behavior

DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pbb.2014.05.017>

Comprovante da Submissão: Artigo submetido em 2015.

Título: Cannabinoid agonist and antagonist into the accumbens shell do not modulate food intake in food deprivation protocol.

Revista: Pharmacology, Biochemistry and Behavior.

Comprovante da aprovação da CEUA.

Artigo publicado em 2014.

Pharmacology, Biochemistry and Behavior 124 (2014) 160–166



Contents lists available at ScienceDirect

Pharmacology, Biochemistry and Behavior

journal homepage: www.elsevier.com/locate/pharmbiochembeh



The microinjection of a cannabinoid agonist into the accumbens shell induces anxiogenesis in the elevated plus-maze



Larissa Kochenborger^{*}, Bruno Rocha Levone, Eduardo Simão da Silva, Ana Paula Dambros Taschetto, Mariana Graciela Terenzi, Marta Aparecida Paschoalini, Moacir Serralvo Faria

Department of Physiological Sciences, Centre of Biological Sciences, Federal University of Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, SC, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:
Received 12 February 2014
Received in revised form 19 May 2014
Accepted 22 May 2014
Available online 2 June 2014

Keywords:
Nucleus accumbens
ACEA
Elevated plus-maze
Anxiety

ABSTRACT

This study investigated the effect of a cannabinoid agonist injected into the shell region of the nucleus accumbens (nAcb shell) on anxiety-related behaviors. The animals (male Wistar rats) were unilaterally microinjected with either ACEA (arachidonyl-2'-chloroethylamide a CB1 receptor agonist) at doses of 0.005, 0.05 or 0.5 pmol, or vehicle (ethanol 0.04% in saline 0.9%) and submitted to the elevated plus-maze (EPM), a pre-clinical test of anxiety. The data showed that rats microinjected with ACEA (0.05 pmol/0.2 μ l) into the nAcb shell exhibited decreased % open arm time and open arm entries in comparison with the control group, which is compatible with an anxiogenic-like effect. To rule out the hypothesis that spread of the drug into the ventricle was responsible for the observed anxiogenic effect, 0.05 pmol ACEA was injected into the lateral ventricle and shown not to alter the responses representative of fear/anxiety and locomotion. The locomotor activity was not changed at the dose of 0.05 pmol ACEA microinjected into the nAcb shell. The present data suggest that activation of cannabinoid receptors in the nAcb shell may modulate fear/anxiety in the EPM.

© 2014 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Cannabinoid receptors belong to the family of G protein-coupled receptors. Endocannabinoids are synthesized in neuronal cells and then taken up and inactivated by hydrolyzation by neuronal and glial cells. (Di Marzo et al., 1998). Endogenous endocannabinoids (ECBs) represent a class of lipid molecules that play an important role in stress (Riebe and Wotjak, 2011), emotionality (McLaughlin and Gobbi, 2012), post-traumatic stress disorder (Akicav, 2013a; Hauer et al., 2014; Neumeister, 2013; Trezza and Campolongo, 2013), emotional memory and learning (Akicav, 2013b; Anastasio, 2013; Giné et al., 2013). The endocannabinoid system modulates diverse neurotransmitter systems and is responsible for many states, including emotional, motivational, cognitive and aging (Clapper et al., 2009; Mechoulam and Parker, 2013; Bilkei-Gorzo, 2012).

The literature demonstrates an important role for the endocannabinoid system, especially CB1 receptors in mood disorders (Witkin et al., 2005). Pharmacological manipulations that increase the activity of ECBs modulate anxiety-like behavior in animal models of anxiety such as the elevated plus maze (EPM) (Sink et al., 2010; Bortolato et al., 2006; Patel and Hillard, 2006; Braida et al., 2007; Ribeiro et al.,

2009) and the light/dark box test (Rutkowska et al., 2006; Scherma et al., 2008).

Microinjection studies with drugs that alter the activity of ECBs reveal that the amygdala, hippocampus (dorsal and ventral) and the dorsolateral periaqueductal gray (dIPAG) are sites where ECBs can modulate anxiety levels (Campos et al., 2010; Roohbahsh et al., 2007, 2009; Lisboa et al., 2008; Moreira et al., 2007; Zarrindast et al., 2008). In addition, CB1 receptors have been identified across the limbic system, as well as co-expression of CB1 and dopamine and serotonin receptors in rat's forebrain (Hermann et al., 2002). The presence of CB1 receptors has also been shown in the nucleus accumbens (nAcb) (Tsou et al., 1998).

The nAcb is an important area of the basal forebrain, involved in many behaviors, such as motor activity (Gargiulo, 1996), motivation and reward (Koob, 2005, 2013; Salamone, 1994), cognition (Annet et al., 1989; Seamans and Phillips, 1994; Setlow and McNaughton, 1998; Usiello et al., 1998), sexual behavior (Damsma et al., 1992), stress (Abercrombie et al., 1989), and ingestive and defensive behaviors (Lopes et al., 2007). The nAcb is a heterogeneous structure anatomically divided into a core area (responsible for motor functions) and a shell (mainly responsible for limbic functions) (Zahn and Brog, 1992).

The nAcb shell region receives influence from a wide variety of neurochemical systems (Heimer et al., 1991; Zahn and Brog, 1992), such as glutamate, opioid peptides, dopamine, norepinephrine and GABA. This influence may be modulating, through the nAcb shell, different aspects of fear conditioning (Pezze and Feldon, 2004), anxiety (Kochenborger et al., 2012; Lopes et al., 2007; Reynolds and Berridge, 2003; Da Cunha

^{*} Corresponding author at: 88040-900 Florianópolis, SC, Brazil. Fax: +55 48 3721 9672.
E-mail addresses: larissakochenborger@gmail.com (L. Kochenborger), bulevone@gmail.com (B.R. Levone), edu_simao@yahoo.com.br (E.S. da Silva), anapaulatasschetto@gmail.com (A.P.D. Taschetto), mterenzi@ufsc.br (M.G. Terenzi), maria@ufsc.br (M.A. Paschoalini), m.serralvo@ufsc.br (M.S. Faria).

Comprovante da Submissão: Artigo submetido em 2015.

Pharmacology, Biochemistry and Behavior Submission - Manuscript Number Assigned

Entrada x



PBB, Elsevier <esubmissionsupport@elsevier.com>

para mim ▾

9 de dez (Há 6 dias) ☆



inglês ▾



português ▾

[Traduzir mensagem](#)

[Desativar para: inglês x](#)

Ms. No.: PBB-D-15-00559

Title: CANNABINOID AGONIST AND ANTAGONIST INTO THE ACCUMBENS SHELL DO NOT MODULATE FOOD INTAKE IN A FOOD DEPRIVATION PROTOCOL

Corresponding Author: Mrs. Larissa Kochenborger

Authors: Ana Paula D Taschetto, Phd Student; Mariana G Terenzi, PhD; Marta A Paschoalini, PhD; Moacir S Faria, PhD

Dear Mrs. Larissa Kochenborger,

Your submission, referenced above, has been assigned the following manuscript number: PBB-D-15-00559

You will be able to check on the progress of your paper by logging on to the Elsevier Editorial System as an author:

<http://ees.elsevier.com/pbb/>

Comprovante da aprovação da CEUA.

<http://notes.ufsc.br/aplic/ceua.nsf/275304c2473aa908325703d00475c75..>

Protocolo

PP00724

Título

Metodologias utilizadas no Laboratório de Neurobiologia de Sistemas Emocionais e Motivacionais/CFS para a avaliação da emocionalidade/memória emocional e ingestão de alimento em ratos.

Data de Entrada

28/11/2011

Resultado:

Aprovado

Data/Prazo

09/03/2012

Considerações

Ofício nº 15/CEUA/PRPE/2012

Do: Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais-CEUA

Ao(à): Prof(a) Dr(a) Moacir Serralvo Faria - Departamento de Ciências Fisiológicas – CCB

Prezado(a) Professor(a),

Em relação ao protocolo de pesquisa sob sua responsabilidade a CEUA deliberou o seguinte:

- APROVADO, por quatro anos para a utilização de seiscientos e vinte e quatro ratos (*Rattus Norvegicus*).
- Procedência do animal: Biotério Central da UFSC

Por ocasião do término desse protocolo, DEVERÁ SER APRESENTADO RELATÓRIO detalhado relacionando o uso de animais no Projeto desenvolvido aos resultados obtidos, conforme formulário ON LINE CEUA.

Atenciosamente,

Relatório Final previsto para (90 dias após término da vigência do protocolo ou no momento da apresentação de um novo protocolo)

Data 16/06/2016

Data 16/03/2012

Parecer(es):



Prof. Assoc. Carlos Rogério Tonussi, D.Sc.
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – PRPE – UFSC
PRESIDENTE

[Abrir Solicitação](#)

[Criar Relatório](#)



[Parecer1_PP00724.pdf](#)



[Parecer2_PP00724.pdf](#)